

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

IMPACTO DAS MOLÉCULAS IMUNORREGULATÓRIAS HLA-G E
GALECTINA-1 E O FATOR DE TRANSCRIÇÃO FOXP3 NA
EVOLUÇÃO CLÍNICA DE PESSOAS VIVENDO COM HIV

NATALIA ALVES CORTELETTE

VITÓRIA
2018

Natalia Alves Cortelette

**IMPACTO DAS MOLÉCULAS IMUNORREGULATÓRIAS HLA-G E
GALECTINA-1 E O FATOR DE TRANSCRIÇÃO FOXP3 NA
EVOLUÇÃO CLÍNICA DE PESSOAS VIVENDO COM HIV**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, do programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. João Alexandre Trés Pancoto

VITÓRIA

2018

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

C827i Cortelette, Natalia Alves, 1992-
Impacto das moléculas imunorregulatórias HLA-G e
Galectina-1 e o fator de transcrição FOXP3 na evolução clínica de
pessoas vivendo com HIV / Natalia Alves Cortelette. - 2108.
114 f. : il.

Orientador: João Alexandre Três Pancoto.
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da
Saúde.

1. HIV (Vírus). 2. Infecções por HIV. 3. Pessoas HIV-positivo.
4. AIDS (Doença). 5. AIDS (Doença) - Pacientes. 6. AIDS
(Doença) - Complicações e sequelas. I. Pancoto, João Alexandre
Três. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de
Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 615.1

Natalia Alves Cortelette


**IMPACTO DAS MOLÉCULAS IMUNORREGULATÓRIAS HLA-G
E GALECTINA-1 E O FATOR DE TRANSCRIÇÃO FOXP3 NA
EVOLUÇÃO CLÍNICA DE PESSOAS VIVENDO COM HIV**

Trabalho de Dissertação de Mestrado aprovado em 09/10/2018 para obtenção
do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Ciências
Farmacêuticas, da Universidade Federal do Espírito Santo

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi / USP



Prof. Dr.ª Daniela Amorim Melgaço Guimarães do Bem / UFES



Prof. Dr. João Alexandre Tres Pancoto (orientador) / UFES

Vitória/ES

2018

AGRADECIMENTOS

O desenvolvimento dessa dissertação somente foi possível graças a toda uma rede de apoio, trabalho, vivências e experiências conjuntas – presentes que a vida me permitiu ter até aqui. Para além de uma pesquisa, toda essa trajetória foi marcada por transformações profundas que me afetaram e seguem em seus cursos de eternos desdobramentos.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. João Alexandre Três Pancoto, pela confiança depositada em mim para que eu pudesse desenvolver essa pesquisa, por todo apoio e orientação;

A toda equipe de funcionários do Centro de Referência e Tratamento (CRT) IST/AIDS do município de Vitória e do HEMOES por tornarem possíveis as coletas das amostras, assim como todos os pacientes e doadores de sangue que se voluntariaram a participar da pesquisa;

À aluna de iniciação científica Djane Lobo, por ter sido minha fiel ajudante e amiga em todas as etapas, principalmente durante a coleta das amostras.

Aos amigos do laboratório, Mayara Santos, Nayara Vargas, Diego Araújo e Amanda Teixeira por terem tornado essa caminhada mais leve e divertida;

Às amigas da vida, Karen Dias, Lorena Araújo, Sthefany Duhz, Jequélie Cássia, Larissa Almeida, Lara Carminati, Lucas Martins e aos novos amigos desse tempo de mestrado, dos mais variados núcleos – Priscila Guimarães, Ramon Lopes, Artur Meirelles, Lucas Peyneau, Gabriel Fernandes - que sempre torceram e participaram de minhas conquistas e são essenciais na minha jornada de vida;

À minha família, pai Moacyr Cortelette, mãe Carmen Cortelette e irmão Moacyr Cortelette Júnior por serem os maiores incentivadores dos meus estudos, além de todo amor e apoio em todos os momentos da vida, sobretudo os mais difíceis nesse último ano;

À querida Priscila Vescovi, por seu trabalho incrível como minha psicóloga nesses últimos seis meses do mestrado, cuidando da minha saúde mental e integral me impulsionando sempre para a minha melhor versão;

À Prof.^a Dr.^a Daniela Amorim Melgaço Guimarães do Bem pelo apoio na realização desse trabalho cedendo a estrutura de seu laboratório para os experimentos e por ter aceitado avaliar essa dissertação na qualificação e também agora na defesa como parte da banca examinadora;

À Prof.^a Dr.^a Janaína Cristiana de Oliveira Crispim Freitas, e aos Pós-docs. Gustavo Martelli Palomino e Marcos Lapim pela colaboração e auxílio no desenvolvimento de protocolos de experimentos durante a pesquisa;

Ao Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi pelo acolhimento em seu laboratório na FCFRP-USP, por ter tornado possível as dosagens das moléculas solúveis e por ter aceitado em participar da avaliação desse trabalho na banca examinadora;

À LÍlian Cataldi que me ensinou, acompanhou e realizou experimentos dessa pesquisa em Ribeirão Preto e à mestranda Talícia que me recebeu em sua casa durante minha estadia nessa cidade;

Aos órgãos e instituições financiadores dessa pesquisa: FAPES, CNPq e UFES.

RESUMO

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) é uma doença causada por uma infecção crônica do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). Desde o início da epidemia da AIDS já são mais de 35 milhões de mortes. A infecção pelo HIV desencadeia alterações inflamatórias comparadas com os da inflamação ativada pelo envelhecimento aumentando o risco para doenças e mortalidade associadas à idade. Associação de inflamação crônica, imunossenescência e efeitos adversos da terapia antirretroviral (TARV) proporciona o desenvolvimento de comorbidades não infecciosas, típicas de idosos, em pessoas que vivem com HIV (PVHIV) relativamente mais jovens como, por exemplo, distúrbios neurocognitivos, cardiovasculares, metabólicos, associados ao sistema ósseo e cânceres não associados ao HIV. O antígeno leucocitário humano (HLA)-G e a Galectina-1 (Gal-1) são moléculas imunorregulatórias que favorecem a progressão da infecção pelo HIV. O polimorfismo genético na região 3' não traduzida (3'UTR) de Inserção (Ins)/Deleção (Del) de 14 pares de bases (pb) no éxon 8 entre os sítios +2961 a +2974 do gene HLA-G (rs371194629), as frequências genótípicas (Del/Del) e (Ins/Del) tem sido associadas com a maior e a frequência genotípica (Ins/Ins) com a menor produção dessa molécula. O fator de transcrição *forkhead box* P3 (FOXP3) está relacionado com atividade reguladora de células Tregs CD4+CD25+ e polimorfismos desse fator contribuem para diminuir ou alterar a funcionalidade dessas células importantes no curso da infecção pelo HIV. Nesse estudo foram avaliadas as correlações entre o polimorfismo de Ins/Del de 14 pb do gene HLA-G, o polimorfismo de único nucleotídeo (SNP) na posição -2383 C/T da região promotora do gene FOXP3 (rs3761549) e a expressão das formas solúveis de HLA-G (sHLA-G) e Gal-1 com as comorbidades e carga viral de pacientes com HIV. Os participantes foram genotipados usando reação em cadeia da polimerase (PCR) para o polimorfismo de Ins/Del de 14pb do HLA-G e PCR com análise de fragmentos de restrição (PCR-RFLP) para o SNP -2383 C/T do FOXP3. Dados clínicos e carga viral dos pacientes foram coletados em análise de prontuário. HLA-G e Gal-1 solúveis foram quantificados por ELISA. Pacientes sem comorbidades apresentaram maior frequência do genótipo Del/Del de 14pb ($p < 0,0136$; OR=0,4431; IC 95%: 0,2333 - 0,8415) que pacientes com comorbidades. As frequências alélicas e genótípicas do SNP -2383 C/T do FOXP3 não foram estatisticamente significantes entre pacientes e controles e pacientes com e sem comorbidades. Como esperado, pacientes Ins/Ins sem e com comorbidades expressaram menos sHLA-G que os controles ($p < 0,0160$). Entretanto, pacientes Ins/Ins com comorbidades expressaram mais Gal-1 que controles e pacientes Ins/Ins sem comorbidades ($p < 0,0019$).

Pacientes sob TARV com baixos níveis de sHLA-G, com comorbidades e altos níveis de Gal-1 exibiram correlação positiva significativa em relação à carga viral ($r=0.9996$; $p=0,0173$). Em conjunto, considerando os resultados encontrados no presente estudo, observa-se que alta expressão de sHLA-G e Gal-1 podem ser associados com melhor ou pior desfecho clínico em PVHIV, respectivamente.

PALAVRAS-CHAVE: HIV. HLA-G. Galectina-1. FOXP3.

ABSTRACT

Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) is a disease caused by a chronic infection of the Human Immunodeficiency Virus (HIV). Since the beginning of the AIDS epidemic, there are more than 35 million deaths. HIV infection triggers inflammatory changes compared to those of the inflammation triggered by aging increasing the risk for age-related diseases and mortality. The association of chronic inflammation, immunosenescence and adverse effects of antiretroviral therapy (ART) provides the development of non-infectious comorbidities, typical of the elderly, in HIV patients, relatively younger, such as neurocognitive, cardiovascular, metabolic disorders, associated with the bone system and non-HIV cancers. Human leukocyte antigen (HLA)-G and Galectin-1 (Gal-1) are immunoregulatory molecules that favor the progression of HIV infection. The genetic polymorphism in the 3' UTR Insertion (Ins)/Deletion (Del) 3' untranslated region within exon 8 between the + 2961 to + 2974 sites of the HLA-G gene (rs371194629), genotypic frequencies (Del/Del) and (Ins/Del) have been associated with genotype and higher frequency (Ins/Ins) with the lowest production of this molecule. The transcription factor forkheadbox P3 (FOXP3) is related to the regulatory activity of CD4+CD25+ Tregs cells, and polymorphisms of this factor contribute to diminish or alter the functionality of these important cells in the course of HIV infection. In this study, the correlations between the 14 bp Ins/Del polymorphism of the HLA-G gene, the single nucleotide polymorphism (SNP) at the -2383 C/T position of the promoter region of the FOXP3 gene (rs3761549) and the expression of soluble forms of HLA-G (sHLA-G) and Gal-1 with the comorbidities and viral load of HIV patients. Participants were genotyped using polymerase chain reaction (PCR) for HLA-G 14bp Ins/Del polymorphism and PCR with restriction fragment analysis (PCR-RFLP) for FOXP3 SNP -2338 C/T. Clinical data and viral load of the patients were collected in medical records. HLA-G and soluble Gal-1 were quantified by ELISA. HIV patients without comorbidities had a higher frequency of the Del/Del genotype of 14bp ($p < 0.0136$; OR = 0.4431; 95% CI: 0.2333 - 0.8415) than patients with comorbidities. The allelic and genotype frequencies of FOXP3 SNP -2383 C/T were not statistically significant between patients and controls and patients with and without comorbidities. As expected, Ins/Ins patients with and without comorbidities expressed less sHLA-G than controls ($p < 0.0160$). However, Ins/Ins patients with comorbidities expressed more Gal-1 than controls and Ins/Ins patients without comorbidities ($p < 0.0019$). Interestingly, patients under ART, with high levels of Gal-1, with comorbidities and low sHLA-G levels,

had a significant positive correlation with viral load levels ($r=0.9996$; $p=0,0173$). Considering the results found in the present study, it is observed that high expression of sHLA-G and Gal-1 can be associated with better or worse clinical outcome in HIV patients, respectively.

KEY WORDS: HIV. HLA-G. Galectin-1. FOXP3.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Vírus, envelhecimento e terapia antirretroviral (TARV) contribuem para o desenvolvimento de várias morbidades durante a infecção pelo HIV.....	26
Figura 2 - Isoformas do HLA-G produzidas por <i>splicing</i> alternativo do RNAm primário.....	31
Figura 3 - Funções imunorregulatórias do HLA-G	34
Figura 4 - Funções imunorregulatórias da Gal-1	38
Figura 5 - Eletroforese em gel de poliacrilamida para detecção do polimorfismo Ins/Del de 14 pb do gene HLA-G.....	49
Figura 6 - Eletroforese em gel de poliacrilamida para detecção do SNP -2383 C/T do gene FOXP3.....	52
Figura 7 – Esquema das amostras nas placas de ELISA.....	53
Figura 8 - Quantificação de HLA-G solúvel por ELISA em pacientes e controles separados por genótipos. Genótipo Ins/Ins (A); Genótipo Ins/Del (B); Genótipo Del/Del (C); Genótipo Ins/Del excluindo pacientes sem TARV (D).....	63
Figura 9 - Quantificação de Gal-1 solúvel por ELISA em pacientes e controles classificados por genótipos. Genótipo Ins/Ins (A); Genótipo Ins/Del (B) e Genótipo Del/Del (C).	64
Figura 10 - Correlação entre os níveis de carga viral e níveis plasmáticos de HLA-G solúvel de pacientes com comorbidades Ins/Ins para o gene HLA-G (n=13) (A) e pacientes com comorbidades Ins/Ins, excluindo o sem TARV (n=12) (B)	65
Figura 11 - Correlação entre os níveis de carga viral e níveis plasmáticos de Gal-1 solúvel de pacientes com comorbidades Ins/Ins (n=13) para o gene HLA-G (A) e pacientes com comorbidades Ins/Ins, excluindo o sem TARV (n=12) (B)	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentrações dos reagentes utilizados para a amplificação do polimorfismo Ins/Del de 14 pb do gene HLA-G	48
Tabela 2 - Perfil de ciclagem da amplificação do polimorfismo Ins/Del de 14-pb do gene HLA-G	48
Tabela 3 - Concentrações dos reagentes utilizados para a amplificação do SNP -2383 C/T do gene FOXP3	50
Tabela 4 - Perfil de ciclagem da amplificação do SNP -2383 C/T do gene FOXP3	50
Tabela 5 - Concentrações dos reagentes utilizados na digestão do produto da PCR do SNP-2383 C/T do gene FOXP3	51
Tabela 6 - Características clínicas dos grupos de pacientes e controles	56
Tabela 7 - Perfil dos pacientes segundo categoria de exposição e sexo	56
Tabela 8 - Número de pacientes que desenvolveram comorbidades, após diagnóstico da infecção pelo HIV, categorizados em desordens conforme perfil das doenças associadas	57
Tabela 9 – Distribuição das frequências (%) alélica e genotípicas do polimorfismo Ins/Del de 14 pb na região 3' UTR do gene HLA-G em pacientes (n=200) e controles (n=200)	58
Tabela 10 - Distribuição das frequências (%) alélica e genotípicas do polimorfismo Ins/Del de 14 pb na região 3' UTR do gene HLA-G em pacientes com comorbidades (n=83) e controles (n=200)	58
Tabela 11 - Distribuição das frequências (%) alélica e genotípicas do polimorfismo Ins/Del de 14 pb na região 3' UTR do gene HLA-G em pacientes com comorbidades (n=83) e pacientes sem comorbidades (n=117)	59
Tabela 12 - Distribuição das frequências alélica e genotípicas do SNP -2383 na região promotora do gene FOXP3 em pacientes do sexo feminino (n=71) e masculino (n=129) e controles do sexo feminino (n=56) e masculino (n=144)	59
Tabela 13 - Distribuição das frequências alélica e genotípicas do SNP -2383 na região promotora do gene FOXP3 em pacientes com comorbidades do sexo feminino (n=33) e masculino (n=50) e controles do sexo feminino (n=56) e masculino (n=144)	60
Tabela 14 - Distribuição das frequências alélica e genotípicas do SNP -2383 na região promotora do gene FOXP3 em pacientes com comorbidades do sexo feminino (n=33) e masculino (n=50) e pacientes sem comorbidades do sexo feminino (n=38) e masculino (n=79)	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3'UTR - Região 3' não traduzida
3TC - Lamivudina
5'URR - Região promotora 5' reguladora não traduzida
A - Adenina
AIDS - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
AgNO₃ - Nitrato de prata
AP-1 - Proteína ativadora 1
APCs - Células apresentadoras de antígenos
ATP - Adenosina trifosfato
CEP - Comitê de Ética em Pesquisa
CCS - Centro de Ciências da Saúde
CLT - Linfócitos T citotóxicos
CRD - *Carbohydrate recognition domain*
CRT - Centro de Referência e Tratamento
CTLA-4 - Antígeno associado ao linfócito T citotóxico 4
Del - Deleção
DTG - Dolutegravir
ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
ENF/T20 - Enfuvirtida
FOXP3 - *Forkhead box P3*
Gal-1 - Galectina-1
GALT - Tecido linfoide associado ao intestino
GLUT4 - Transportador de glicose 4
HEMOES - Hemocentro do Espírito Santo
HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana
HLA - Antígeno Leucocitário Humano
IF - Inibidores de fusão
IFN - Interferon
IL - Interleucina
INI - Inibidor de integrase
Ins - Inserção

IP - Inibidores de protease

IST - Infecções Sexualmente Transmissíveis

ITRN - Inibidor da transcriptase reversa análogos a nucleosídeo

ITRNN - Inibidor da transcriptase reversa não análogo a nucleosídeo

ITRNt - Inibidor da transcriptase reversa análogos a nucleotídeo

LacNAc - N-acetil-lactosaminas

LGALS1 - *Lectin galactoside-binding soluble 1*

LPS - Lipopolissacarídeo bacteriano S

MHC - Complexo principal de histocompatibilidade

MVC - Maraviroque

NFAT - Fator nuclear de linfócitos T ativado

NK - Célula *natural killer*

ONU - Organização das Nações Unidas

Pb - Pares de bases

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PCR-RFLP - PCR com análise de fragmentos de restrição

PD-1 - Proteína de morte programada 1

Pre-BCR - pré-receptor de células B

PVHIV - Pessoas que vivem com HIV

RNAm - RNA mensageiro

ROS - Espécies reativas de oxigênio

SREBP-1 - Proteína de ligação a elemento regulador de esterol 1

sHLA-G - HLA-G solúvel

SNP - Polimorfismo de único nucleotídeo

T - Timina

TARV - Terapia antirretroviral

TCR - Receptor de células T

TDF - Tenofovir

TNF - Fator de necrose tumoral

Tr1 - Tregs FOXP3-

Tregs - Células T regulatórias

UDI - Usuários de drogas injetáveis

UFES - Universidade Federal do Espírito Santo

UNAIDS - Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 HIV/AIDS: ASPECTOS GERAIS.....	16
1.1.1 O vírus	17
1.1.2 Diagnóstico	17
1.1.3 Tratamento	18
1.1.4 Transmissão e tropismo	19
1.1.5 História natural da infecção	20
1.1.6 Imunopatogenia.....	22
1.1.7 Infecção pelo HIV e o desenvolvimento de comorbidades.....	26
1.2 HLA-G: ESTRUTURA E FUNÇÕES	29
1.3 FATOR DE TRANSCRIÇÃO FOXP3: ESTRUTURA E FUNÇÕES.....	35
1.4 GAL-1: ESTRUTURA E FUNÇÕES	36
1.5 MOLÉCULAS IMUNORREGULATÓRIAS E A INFECÇÃO PELO HIV	39
2. OBJETIVOS.....	43
2.1 OBJETIVO GERAL	43
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
3. MATERIAL E MÉTODOS	44
3.1 DESENHO DO ESTUDO.....	44
3.2 ASPECTOS ÉTICOS	44
3.3 COLETA DAS AMOSTRAS	44
3.3.1 Local da coleta, critérios de inclusão e exclusão	44
3.3.2 Obtenção do sangue total, plasma e soro	45
3.4 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA	45
3.5 ANÁLISE DE PRONTUÁRIOS	47
3.6 POLIMORFISMO INS/DEL DE 14 PB DO GENE HLA-G (rs371194629)	47
3.7 SNP -2383 C/T DO GENE FOXP3 (rs3761549)	49

3.8 DOSAGENS DAS FORMAS SOLÚVEIS DE HLA-G (HLA-G1 E HLA-G5) E GAL-1	52
3.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	54
4. RESULTADOS.....	55
4.1 PERFIL CLÍNICO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO	55
4.2 PERFIL GENÉTICO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO.....	57
4.2.1 Análise do Polimorfismo de Ins/Del de 14 pb do gene HLA-G (rs371194629).....	57
4.2.2 Análise do SNP -2383 C/T do gene FOXP3 (rs3761549).....	59
4.3 DOSAGENS DAS FORMAS SOLÚVEIS DE HLA-G E GAL-1.....	61
4.3.1- Níveis plasmáticos de HLA-G (HLA-G1 E HLA-G5)	61
4.3.2 - Níveis plasmáticos de Gal-1	62
4.4 - CORRELAÇÕES DE CARGA VIRAL COM NÍVEIS PLASMÁTICOS DE HLA-G E GAL-1 SOLÚVEIS.....	64
5. DISCUSSÃO.....	66
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	76
REFERÊNCIAS	77
ANEXO A – APROVAÇÃO DO CEP	102
ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E .ESCLARECIDO - PACIENTES	109
ANEXO C - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E .ESCLARECIDO - CONTROLES	112

1. INTRODUÇÃO

1.1 HIV/AIDS: ASPECTOS GERAIS

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) é uma doença causada por uma infecção crônica do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (WHO, 2017). Consiste numa patologia caracterizada pelo aparecimento de infecções oportunistas e neoplasias (PINCHING, 1984) devido a um estado de profunda imunossupressão causado pelo vírus com a depleção progressiva de linfócitos T CD4+, sendo esta a principal célula envolvida no curso da doença (DALGLEISH et al., 1984; KLATZMANN et al., 1984; MADDON et al., 1986).

Os primeiros casos da síndrome foram associados na década de 80, nos EUA, onde quatro pessoas apresentaram quadro de pneumonia causada por *Pneumocystis jirovecii* e comprometimento do sistema imunológico (GOTTLIEB et al., 1981). No início da década de 80, foi isolado o retrovírus do sangue de pacientes acometidos por esta doença, provando pela primeira vez que a AIDS é causada por um agente infeccioso (BARRÉ-SINOUSSE et al., 1983; GALLO et al., 1983).

Desde o início da epidemia da AIDS já são mais de 35 milhões de mortes (WHO, 2018). Considerada uma das principais causas de morbimortalidade no mundo (GBD, 2013), grandes esforços foram mobilizados para seu controle nas últimas décadas. Contudo, estimou-se que em 2016 ainda 36,7 milhões de pessoas viviam com HIV no mundo sendo que 11 milhões delas sequer tinham sido diagnosticadas (WHO, 2017). Além disso, nesse mesmo ano, cerca de 1,0 milhão de pessoas morreram de causas relacionadas ao HIV no mundo (UNAIDS, 2017; WHO, 2017).

Dentre os avanços para conter a epidemia destaca-se a introdução da terapia antirretroviral (TARV) em 1996 que possibilitou o aumento da expectativa de vida das pessoas que vivem com HIV (PVHIV). Para aquelas que iniciaram tratamento aos 20 anos, após 2008, com baixa carga viral, a expectativa é de 78 anos, bem similar ao restante da população saudável. Pessoas acima de 50 anos já representam um terço das PVHIV no mundo caracterizando o atual perfil crônico da doença (GBD, 2015), com os efeitos do

envelhecimento mais evidentes (GUARALDI et al., 2014; GUARALDI; SILVA; STENTARELLI, 2014).

1.1.1 O vírus

O HIV é um agente infeccioso do gênero *Lentivirus* e família *Retroviridae* (HAHN et al., 2000; HASELTINE, 1991). O vírus é dividido geneticamente em dois tipos, o HIV-1 e o HIV-2. O primeiro é o principal responsável pela transmissão em escala mundial da doença, sendo dividido em quatro grupos, M, N, O e P. O grupo M é o mais predominante e, por sua vez, é classificado em nove subtipos (A-D, F-H, J e K) (HEMELAAR, 2012). Os subtipos podem também se recombinar geneticamente provando que o vírus apresenta grande variabilidade genética. No mundo as infecções são causadas principalmente pelo subtipo C, seguido do A e B. O subtipo B tem sido descrito como o mais prevalente no Brasil (ALENCAR et al., 2013; HEMELAAR, 2012).

Estruturalmente, apresenta núcleo interno que contém duas cópias de RNA de cadeia simples e enzimas necessárias para os eventos iniciais de replicação viral (protease, transcriptase reversa e integrase). Esse núcleo é encapsulado por um nucleocapsídeo, que por sua vez é revestido por matriz proteica e membrana lipídica. Externamente há uma membrana composta por glicoproteínas que formam o envelope viral (ENGELMAN; CHEREPANOV, 2012; HASELTINE, 1991).

1.1.2 Diagnóstico

O diagnóstico da infecção pelo HIV acontece com testes de triagem e confirmatórios. Dentre os testes de triagem existem os testes rápidos (imunoensaios simples) de fluido oral e sangue total e os imunoensaios de terceira e quarta geração capazes de detectar anticorpos específicos para o vírus (BRASIL, 2016). Resultado não reagente na primeira triagem requer que seja feito novo teste após trinta dias nos casos de suspeita de infecção pelo HIV (BRASIL, 2016). Sendo reagente na triagem, é exigida a realização de testes confirmatórios (BRASIL, 2016; COHEN et al., 2010; FIEBIG et al., 2003).

Os testes confirmatórios convencionais (western blot, imunoblot, ou imunoblot rápido) são capazes de detectar proteínas virais. Dentre as mais relevantes estão a p24 do capsídeo

viral e as gp41, gp120 e gp160 do envelope viral. Esses testes são menos sensíveis que os testes de triagem de terceira e quarta geração, sendo inadequados para a detecção de infecções recentes além de serem mais caros (BRASIL, 2016; COHEN et al., 2010; FIEBIG et al., 2003).

Os testes moleculares, que detectam a presença de RNA viral, são os mais eficazes para a confirmação diagnóstica de infecções agudas, uma vez que os pacientes podem estar dentro do período de soroconversão e/ou não possuem ainda proteínas virais detectáveis no plasma (COHEN et al., 2010; FIEBIG et al., 2003; MCMICHAEL et al., 2010).

1.1.3 Tratamento

Atualmente, não há imunização para evitar o contágio ou tratamento que cure as PVHIV. O tratamento existente visa controle da replicação viral e redução de transmissibilidade por meio de TARV tendo sua eficácia monitorada pelos exames de contagem de linfócitos T CD4+ e carga viral realizados periodicamente (WHO, 2016). No Brasil, o Ministério da Saúde estimula o início imediato da TARV para todas PVHIV, independente da contagem de linfócitos T CD4+ (BRASIL, 2018).

Os antirretrovirais atuam em diferentes níveis do ciclo replicativo viral nas células hospedeiras. Há quatro principais classes recomendadas para os protocolos de tratamento dos sistemas de saúde pública do mundo: inibidor da transcriptase reversa análogos de nucleosídeo ou nucleotídeo (ITRN ou ITRNt); inibidor da transcriptase reversa não análogo de nucleosídeo (ITRNN); inibidor de protease (IP) e inibidor de integrase (INI) (WHO, 2016).

Existem ainda os inibidores de fusão (IF), como o peptídeo Enfuvirtida (ENF/T20), cujo alvo é a gp41 do envelope viral, e o inibidor de correceptor Maraviroque (MVC), também conhecido como antagonista do CCR5. Contudo suas aplicações atualmente são restritas às condições clínicas específicas dos pacientes (BRASIL, 2018; XU; GUO; WU, 2014; ZHANG; LI; JIANG, 2014).

O tratamento de primeira linha no Brasil, adotado a partir de 2017, é a associação de dois medicamentos da classe ITRNt e ITRN, Tenofovir (TDF) e Lamivudina (3TC), com um medicamento da classe INI, o Dolutegravir (DTG) (BRASIL, 2017a; BRASIL 2018).

Escolhas alternativas de classes e medicamentos podem ser feitas nos casos em que o paciente apresente alguma contraindicação, reações adversas ou falha terapêutica devido à resistência viral (BRASIL, 2017a; BRASIL, 2018). Vale destacar a importância da melhor escolha terapêutica possível, a fim de evitar condições adversas que propiciem o desenvolvimento ou intensifiquem comorbidades não infecciosas nessa população já fragilizada pelo próprio processo inflamatório crônico da infecção pelo HIV (BRASIL, 2018; NASI et al., 2014).

1.1.4 Transmissão e tropismo

A transmissão ocorre por meio do contato de fluidos corporais contaminados com tecido de mucosa, sangue ou pele não íntegra (DEEKS et al., 2015). Essas exposições ocorrem principalmente pelas vias sexual, parenteral (transfusão sanguínea, compartilhamento de materiais no uso de drogas injetáveis, ferimento por agulhas) e vertical (durante a gestação, no período de parto ou pela amamentação) (PATEL et al., 2014; WHO, 2017).

O aumento do risco de transmissão tem sido associado a alguns fatores como: níveis elevados de carga viral no plasma (QUINN et al., 2000) ou em secreções genitais (BAETEN et al., 2011); presença de outras infecções sexualmente transmissíveis (IST) como sífilis, herpes, clamídia, gonorreia, tricomoníase, candidíase (GALVIN; COHEN, 2004; ROTTINGEN; CAMERON; GARNETT, 2001); e características fenotípicas virais como por exemplo maior conteúdo de proteínas de envelope, maior interação com células dendríticas e resistência à ação antiviral de Interferon (IFN)- α (PARRISH et al., 2013).

Indivíduos saudáveis podem estar mais susceptíveis à infecção se apresentarem maiores níveis de linfócitos T CD4⁺ ativados no local de exposição, devido à presença de inflamação causada por outras infecções ou trauma na região afetada (HAASE, 2005). Além disso, a circuncisão está associada à proteção contra a infecção pelo HIV sugerindo que células encontradas no prepúcio (células T CD4⁺ e células dendríticas) podem facilitar a transmissão do HIV (WEISS; QUIGLEY; HAYES, 2000).

Uma vez transmitido, o tropismo do HIV-1 é controlado pelo seu gene *env* que codifica as glicoproteínas de superfície gp120 e transmembrana gp41 constituintes do envelope viral. Essas, por sua vez, interagem com receptores e correceptores específicos de células que se tornam alvo para infecção (CONNOR et al., 1997).

As células alvo apresentam como receptor primário a molécula CD4, expressa na superfície de monócitos, macrófagos, células dendríticas, micróglia e linfócitos T circulantes (DALGLEISH et al., 1984; DEEKS, 2015; KLATZMANN et al., 1984; MADDON et al., 1986). Os correceptores são receptores de quimiocina CCR5 e CXCR4 (DOMS, 2000; FENG et al., 1996; WEISS, 2013) expressos diferentemente em subpopulações de células T. CCR5 é expresso em linfócitos T de memória, monócitos, macrófagos e células dendríticas, enquanto que o receptor para CXCR4 é expresso em diversas células incluindo linfócitos T *naive* e de memória (DEEKS, 2015).

Os alvos preferidos para o estabelecimento da infecção são os linfócitos T ativados, que por razões não tão bem definidas são mais permissivas à infecção do que aqueles que não foram ativados (DEEKS, 2015). Embora células dendríticas sejam difíceis de infectar com HIV-1, elas são capazes de capturar o vírus e promover transinfecção de linfócitos T próximos a estas células (GEIJTENBEEK et al., 2000; WU; KEWALRAMANI, 2006). Os vírus também podem anexar à rede dendrítica folicular, que os mantém nos folículos de células B nos linfonodos (DEEKS, 2015). Raros indivíduos com deleção CCR5 homozigota foram identificados como resistentes à infecção pelo HIV-1, uma vez que a mutação CCR5Δ32 bloqueia a entrada viral (DEAN et al., 1996; LIU et al., 1996; SAMSON et al., 1996).

1.1.5 História natural da infecção

A história natural da infecção não tratada pelo HIV-1 se estabelece em fases. O início se dá pela fase eclipse, seguida da fase aguda. Elas constituem a infecção primária do vírus. O estabelecimento do *set point* determina o início da fase crônica da infecção, e a AIDS, por sua vez, caracteriza a fase crônica tardia. (DEEKS, 2015; MOIR; CHUN; FAUCI, 2011).

A fase eclipse tem início após a transmissão do vírus, durando aproximadamente dez dias, com nível de RNA viral no plasma indetectável (COHEN et al., 2010). Os vírus que alcançam e cruzam o epitélio mucoso possivelmente o fazem por transcitose ou por contato direto com células dendríticas intraepiteliais (HAASE, 2005). Ocorre, então, a disseminação para órgãos linfóides em número suficiente para estabelecer e manter a produção de vírus,

além de fixar um reservatório viral latente, principalmente em linfócitos T CD4⁺ de memória (DEEKS, 2015; HAASE, 2005).

A fase aguda se estabelece após duas a quatro semanas da transmissão e os níveis de RNA viral se tornam detectáveis no plasma (COHEN et al., 2010). Na ausência de uma resposta imune e tratamento, o vírus se replica alcançando níveis máximos de viremia plasmática de $10^6 - 10^7$ cópias/mL (LITTLE, et al., 1999; PIATAK et al., 1993).

Essa replicação é acompanhada do surgimento de sinais e sintomas comuns a outras infecções virais como febre, adenopatias, faringite, exantema, mialgia e cefaleia (GURUNATHAN et al., 2009; SCHACKER et al., 1996; TINDALL et al., 1988). A severidade dos sintomas tem se correlacionado com os níveis alcançados de carga viral nessa fase (KELLEY; BARBOUR; HECHT, 2007). Essa fase tem sido relacionada com uma profunda destruição de linfócitos T CD4⁺ CCR5⁺ de memória no tecido linfoide associado ao intestino (GALT) (BRENCHLEY et al., 2004; VEAZEY et al., 1998).

Quando a resposta imune começa a se desenvolver, com atuação de células T CD8⁺ citotóxicas, células *natural killer* (NK) (KOUP et al., 1994) e soroconversão - presença de anticorpos IgM em quantidades detectáveis no plasma - (FIEBIG et al., 2003), acontece o decaimento da carga viral até alcançar o *set point*, no qual a replicação viral se torna relativamente estável, ficando assim frequentemente por anos (MOIR; CHUN; FAUCI, 2011). O nível em que essa viremia se estabiliza é um importante determinante da taxa de progressão da doença em indivíduos infectados não tratados (MELLORS, et al., 1996). Os níveis de linfócito T CD4⁺ tendem a aumentar com a queda da viremia até o *set point*, contudo voltam a cair progressivamente com o avanço da doença não tratada (DEEKS et al., 2015).

Durante a infecção crônica, à medida que os linfócitos T CD4⁺ são destruídos, desenvolve-se imunodeficiência e inflamação persistente crônica (KLIMAS; KONERU; FLETCHER, 2008). A contagem típica de células T CD4⁺ em adultos está entre 500 e 1200 células/ μ L. A redução do número de células para valores abaixo de 350 células/ μ L, aumenta o risco de iniciar complicações por infecções oportunistas, podendo levar para doenças mais avançadas (contagem abaixo de 100 células/ μ L) (DEEKS et al, 2015).

A AIDS tem sido definida baseada na presença de infecção por HIV associado à contagem de células T CD4+ abaixo de 200 células/ μ L ou à presença de uma condição definidora de AIDS (CDC, 2008). Dentre essas condições estão o desenvolvimento de infecções oportunistas como hepatites virais, tuberculose, toxoplasmose, pneumonia e cânceres relacionados como sarcoma de Kaposi e linfoma não-Hodgkins (LACKNER; LEDERMAN; RODRIGUEZ, 2012).

1.1.6 Imunopatogenia

A infecção pelo HIV desencadeia alterações inflamatórias durante todo o curso da infecção (MCMICHAEL et al; 2010). Durante a fase aguda, ocorre uma resposta inflamatória significativa representada pelo aparecimento de proteínas de fase aguda como a proteína amiloide A, e liberação de muitas citocinas inflamatórias principalmente interferons tipo I (IFN- α e IFN- β) e Interleucinas (IL), como IL-15, seguidas da quimiocina CXCL10, IL-18, fator de necrose tumoral (TNF), IFN- γ , IL-22 e IL-10 (MCMICHAEL et al; 2010). Essa resposta coincide com o aumento expressivo da carga viral plasmática (STACEY et al., 2009).

Embora as células dendríticas da submucosa intestinal sejam as primeiras a produzirem grande quantidade de citocinas (LI et al., 2009) com a evolução da infecção, inúmeras outras células passam a produzi-las como monócitos, macrófagos (BRENCHLEY et al., 2006), células NK e células T (MCMICHAEL et al; 2010).

A população de linfócitos T CD4+ CCR5+ residente na submucosa do GALT, é intensamente infectada e destruída, ocasionando ruptura dessa barreira imune (BRENCHLEY et al., 2004; VEAZEY et al., 1998). Essa alteração da imunidade local facilita a disseminação de produtos bacterianos, como lipopolissacarídeo bacteriano S (LPS), para circulação sanguínea contribuindo para o processo de disfunção e ativação imune que caracteriza a evolução da doença (BRENCHLEY et al., 2006; BRENCHLEY; PRICE; DOUEK, 2006).

Mesmo com a carga viral plasmática reduzindo significativamente no fim da infecção primária, a ativação imune persiste no estágio crônico da doença (MCMICHAEL et al; 2010). Nessa fase, notam-se níveis aumentados e persistentes de citocinas pró-inflamatórias, como

TNF- α , IL-1, IL-6, elevação da proteína C reativa e do dímero D, mesmo sob TARV (BAKER et al., 2011).

O processo inflamatório persistente ocorre provavelmente por diversos fatores que incluem a contínua replicação viral, perda de células T regulatórias (Tregs) e outras moléculas regulatórias (APPAY; SAUCE, 2008), translocação de LPS do GALT para o plasma (BRENCHLEY et al., 2006), co-infecções oportunistas (NAERGER et al., 2010) e fibrose irreversível dos órgãos linfóides devido à deposição de colágeno (SCHACKER et al., 2002).

Embora células infectadas produtivamente morram pelo efeito citopático do vírus, apenas uma proporção pequena de células T CD4⁺ são infectadas produtivamente (LIU; LIEBERMAN, 2017). Recentes estudos têm atribuído à depleção de linfócitos T CD4⁺ a ativação de inflamossoma (DOITSH et al., 2014; MONROE et al., 2014). Evidências demonstraram que o HIV entra em células T CD4⁺ em repouso de tecidos linfóides, começam seu ciclo replicativo, contudo os eventos tardios de formação de novas partículas virais são interrompidos. Os transcritos reversos de DNA viral são reconhecidos pelo sensor proteico IFI16 de DNA exógeno, desencadeando a formação de inflamassoma que ativa caspase-1 e o processo conhecido como piroptose (DOITSH et al., 2014; MONROE et al., 2014).

Piroptose corresponde a um processo inflamatório intenso de morte celular programada no qual há liberação de conteúdo citoplasmático e citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1 β (DOITSH et al., 2014; LIU; LIEBERMAN, 2017). Essa via de morte celular relaciona dois eventos chave na infecção pelo HIV – a depleção de linfócitos T CD4⁺ e a inflamação crônica – e cria um ciclo patogênico contínuo onde células T CD4⁺ que estão morrendo liberam sinais inflamatórios que atraem mais células para o sítio de morte celular produzindo mais inflamação, mesmo quando a replicação viral é diminuída com uso da TARV (DOITSH et al., 2014; LIU; LIEBERMAN, 2017).

Sinais inflamatórios induzem regulação positiva de selectinas e de membros da superfamília das imunoglobulinas, particularmente ICAM-1 e/ou VCAM-1, que medeia a migração trans endotelial de vários tipos de leucócitos circulantes para órgãos linfóides (LUSTER; ALON; VON ANDRIAN, 2005). Os leucócitos mais abundantes em humanos saudáveis são os neutrófilos. Essas células de vida curta expressam um número extensivo de moléculas de adesão para rápida ligação aos receptores induzidos pela inflamação no

endotélio ativado. Neutrófilos são essenciais no combate às infecções bacterianas e fúngicas, entretanto ao serem ativados liberam mediadores citotóxicos que promovem necrose e dano tecidual (LINKERMANN et al., 2014). Além disso, enzimas liberadas por neutrófilos como elastase, proteinase-3, granzima-A e catepsina G promovem a formação de depósitos extracelulares de precursores pró-IL-1 β (FANTUZZI et al., 1997; GUMA et al., 2009; JOOSTEN et al., 2009). Os monócitos, por sua vez, após recrutamento para os linfonodos, se diferenciam em macrófagos residentes no tecido ou em células dendríticas. Essas células apresentadoras de antígeno profissionais são atraídas especificamente pelos sinais inflamatórios extracelulares como a liberação de ATP e uridina trifosfato por células mortas (RAVICHANDRAN, 2011), e são preparadas para ativar o processo de piroptose mediado por NLP3 ao ligar ATP à superfície de receptores purinérgicos P2X7 (MARIATHASAN et al., 2006).

Células mieloides diferenciadas expressam constitutivamente pró-IL-18 e liberam níveis elevados de IL-18 bioativo e pró-inflamatório durante piroptose (PUREN; FANTUZZI; DINARELLO, 1999). Níveis altos sustentados de IL-18 são observados no plasma de PVHIV, especialmente em estágios avançados da doença (TORRE; PUGLIESE, 2006). Portanto, enquanto a principal fonte de IL-1 β é a piroptose de células T CD4⁺ dos tecidos linfóides mediada pelo HIV, a principal fonte de IL-18 e citocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-15 e TNF- α é resultado de uma retroalimentação da piroptose envolvendo macrófagos residentes nos tecidos e células dendríticas durante a fase crônica da infecção (DOITSH et al., 2014). Esses eventos estabelecem um estado crônico de inflamação, levando a progressão da doença e dano tecidual (ZENG et al., 2011). Promovem também a manutenção do reservatório latente de HIV no organismo por meio da ação desregulada das citocinas IL-7 ou IL-15 estimulando a proliferação homeostática de células T CD4⁺ de memória (DOITSH et al., 2014).

Os mecanismos envolvidos nessa ativação imune crônica em portadores do HIV têm sido comparados com os da inflamação ativada pelo envelhecimento (APPAY; SAUCE, 2008), aumentando o risco para doenças e mortalidade associadas à idade (KULLER et al., 2008; SHLIPAK et al., 2003; WALSTON et al. 2002). Tem sido demonstrada que a ativação de marcadores associados com envelhecimento imunológico permanece elevada em PVHIV tratados, incluindo IL-6, TNF- α , indicando que PVHIV mesmo sob TARV experimentam

efeitos do envelhecimento de forma prematura ou acelerada (REGIDOR et al., 2011; WADA et al., 2015).

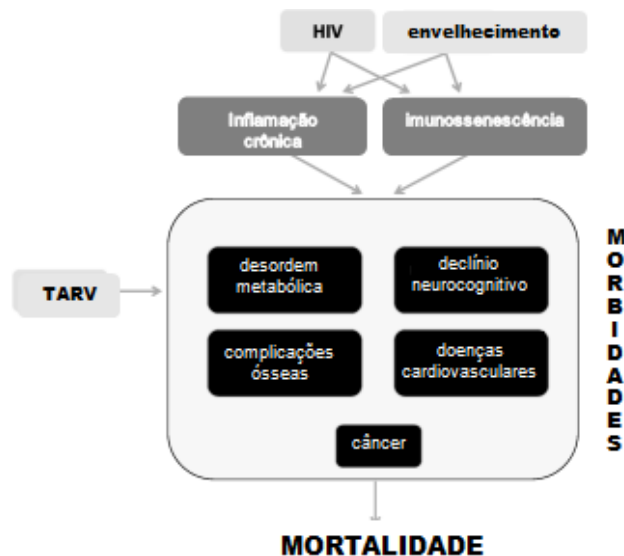
Essa ativação também está relacionada ao aparecimento de células T CD4+, T CD8+ e células B com sinais de exaustão e envelhecimento ao expressarem proteína de morte programada 1 (PD-1) (DAY et al., 2006; TRAUTMANN et al., 2006) e antígeno associado ao linfócito T citotóxico 4 (CTLA-4) (KAUFMANN et al., 2007). Estas células, por sua vez, perdem suas capacidades proliferativas e funções efetoras, contribuindo para a persistência da infecção viral (APPAY; DOUEK; PRICE, 2008; MOIR; FAUCI, 2009).

Existe ainda a tendência das células expressarem perfis distintos de receptores, diminuindo os associados aos linfonodos (CD62L, CCR7, CXCR4, CXCR5) e aumentando aqueles associados aos tecidos extra linfóides (CXCR3, CCR6, CD11c) (MOIR et al., 2008; WHERRY et al., 2007). Dada a importância do ambiente germinativo dos linfonodos para geração de ótimas respostas imune celular e humoral, esses achados sugerem que a saída precoce dessas células para os tecidos extralinfóides podem contribuir para a ineficácia da resposta imune contra o HIV na fase crônica (MOIR et al., 2008; WHERRY et al., 2007).

Como consequência, a associação dos quadros de inflamação crônica, imunossenescência (envelhecimento do sistema imune) e efeitos adversos associados à TARV proporciona o desenvolvimento de comorbidades não infecciosas, típicas de idosos, em PVHIV relativamente mais jovens. como, por exemplo, distúrbios neurocognitivos, cardiovasculares, metabólicos, associados ao sistema ósseo e cânceres não associados ao HIV (NASI et al., 2014) (Figura 1).

Os precisos mecanismos da ativação imune crônica persistente, que contribuem para o surgimento de comorbidades, são poucos entendidos e o impacto do envelhecimento de PVHIV tratados ainda não foi esclarecido (NASI et al., 2016). Assim, a fim de reduzir a morbidade e a mortalidade é necessário compreender as causas da inflamação e desenvolver intervenções atenuadoras dos efeitos crônicos da inflamação e ativação imune em PVHIV (NASI et al., 2016).

Figura 1 - Vírus, envelhecimento e terapia antirretroviral (TARV) contribuem para o desenvolvimento de várias morbidades durante a infecção pelo HIV.



Fonte: Adaptada de NASI et al., 2016

1.1.7 Infecção pelo HIV e o desenvolvimento de comorbidades

Muitas PVHIV têm desenvolvido anormalidades metabólicas como hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia e resistência à insulina, importantes fatores de risco para o desenvolvimento de síndrome metabólica e doenças cardiovasculares (GUARALDI et al., 2009; JANISZEWSKI et al., 2011; PAULA; FALCAO; PACHECO, 2013). Entretanto, diferente da população geral, PVHIV são expostas a outros fatores de risco adicionais como os efeitos adversos de TARV combinados com inflamação crônica persistente (GOUGEON et al., 2004; WORM; LUNDGREN, 2011).

Estudos indicam a associação entre ocorrência de síndrome metabólica e uso de TARV, especialmente Inibidores de Proteases (IP) ou Inibidores da Transcriptase Reversa Análogos a Nucleosídeos (ITRN) (GIBELLINI et al., 2015). Atualmente, tem sido aceito amplamente que IP podem ser a causa de comuns efeitos adversos em PVHIV, incluindo dislipidemia, resistência à insulina e lipodistrofia desencadeadoras de doenças cardiovasculares e cerebrais (LV; CHU; WANG, 2015). Esses medicamentos podem induzir acúmulo intracelular de lipídeos e colesterol livre ao diminuir atividade nuclear da proteína de ligação a elemento regulador de esterol 1 (SREBP-1), um fator de transcrição derivado do retículo endoplasmático que regula a expressão de genes envolvidos na lipogênese (ZHOU et al., 2006). IP também podem bloquear a absorção de glicose em adipócitos ao inibir o

transportador de glicose 4 (GLUT4) e inibir proteassoma causando acúmulo de proteínas, estresse do retículo endoplasmático e processos de autofagia (GILLS et al., 2007; MURATA; HRUZ; MUECKLER, 2002). Por sua vez, a classe de ITRN contribui na patogênese de lipodistrofia relacionada à TARV por inibir a atividade enzimática da DNA polimerase mitocondrial gama, resultando em inibição da cadeia respiratória e da produção de adenosina trifosfato (ATP) com disfunção mitocondrial levando ao dano metabólico irreversível da morte de adipócitos (NASI et al. 2011).

Contudo, mesmo com o desenvolvimento de TARV com menor efeito adverso metabólico, a ativação crônica do sistema imune e a inflamação permanecem como os maiores contribuidores no risco de doenças cardiovasculares (DRELICHOWSKA; KNYSZA; WITKIEWICZA, 2015; PAO; LEE; GRUNFELD, 2008; STEIN; HSUE, 2012). Nos países em desenvolvimento, aproximadamente 20% das mortes pelo HIV/AIDS, têm sido atribuídas a essas doenças (KENGNE et al., 2013). Estudos recentes tem sugerido que monócitos são as principais fontes de mediadores inflamatórios que promovem doenças cardiovasculares, mesmo em pacientes tratados (ANZINGER et al., 2014). Por exemplo, níveis plasmáticos de CD14 e CD163 solúveis (marcadores de monócitos/macrófagos ativados) estão associados com rápida progressão de aterosclerose da carótida e com inflamação da parede arterial, respectivamente, indicando que ativação de monócitos e macrófagos desempenha função chave em doenças cardiovasculares de PVHIV (SANDLER et al., 2011; SUBRAMANIAN et al., 2012). A citocina pró-inflamatória IL-6, outro mediador inflamatório produzido por monócitos e macrófagos ativados, também tem sido relacionada com maiores chances no desenvolvimento de doenças cardiovasculares uma vez que foi encontrada em níveis elevados em PVHIV mesmo sob TARV (DUPREZ et al., 2012). Adicionam-se outras anormalidades imunológicas resultantes diretamente da infecção pelo HIV como, por exemplo, baixas contagens de células T CD4+ e falha em restaurar as contagens periféricas de células T CD4+ para níveis normais após TARV (FRIIS-MOLLER; REISS; SABIN, 2007; MOCROFT et al., 2007).

Anormalidades comportamentais, disfunções motoras e demência são manifestações clínicas bem conhecidas de distúrbios neurocognitivos associadas ao HIV (ANTINORI et al., 2007). Essas distúrbios possuem diferentes severidades clínicas que variam de deterioração neurocognitiva assintomática, moderada até a mais severa demência. (GHAFOURI et al., 2006). O HIV pode entrar no sistema nervoso central logo que a infecção se inicia,

constituindo um reservatório para o vírus mesmo em PVHIV sob TARV, podendo ocorrer perda neural persistente e progressiva na infecção crônica também nos casos de carga viral suprimida (GONGVATANA et al., 2013). Dessa forma, danos neurais podem ser causados não só pelo vírus em si, mas também pela ativação imune crônica e inflamação (COHEN; SEIDER; NAVIA, 2015). De forma complementar a neurotoxicidade causada diretamente por proteínas virais ou por algumas drogas que atravessam a barreira hematoencefálica (LETENDRE et al., 2004).

O HIV se propaga de monócitos infectados para células não infectadas no cérebro, como micróglia e astrócitos, ativando inflamação e respostas imunes envolvendo a liberação de citocinas, quimiocinas e de espécies reativas de oxigênio (ROS) (ANDERSON et al., 2002; COHEN; SEIDER; NAVIA, 2015). Disfunções metabólicas mitocondriais em PVHIV aumentam a produção de ROS levando ao estresse oxidativo e, como consequência, a replicação viral, inflamação e o sistema imunológico são afetados tornando pacientes mais sensíveis aos efeitos tóxicos da TARV (ANDERSON et al., 2002). O estresse oxidativo e o dano celular causado pelas ROS foram propostos como uma importante via subjacente de envelhecimento cerebral, juntamente com a sinalização de insulina anormal (HARMAN et al., 1976; MATTSON; HAUGHEY; NATH, 2005). A disfunção mitocondrial também tem sido associada com aumento de neuroinflamação, glutamato e acúmulo de cálcio, alterações essas que podem ser neurotóxicas (TIAN et al., 2012).

Alterações ósseas devido à queda da densidade mineral óssea levando à osteopenia, osteoporose e fraturas, têm se tornado importante especialmente com o envelhecimento das PVHIV (ERLANDSON; GUARALDI; FALUTZ, 2016). Estudos tem relatado que PVHIV possuem três vezes mais chances de fraturas do que pessoas não infectadas (COLLIN et al., 2009; TRIANT et al., 2008). Mudanças na composição óssea são de origens multifatoriais e derivam de interações complexas entre fatores de risco tradicionais para osteoporose, baixas dosagens de vitamina D, infecção pelo HIV, TARV e inflamação persistente (ERLANDSON; GUARALDI; FALUTZ, 2016). A TARV parece exacerbar a perda óssea independente do tipo de regime (BROWN et al., 2009).

Contudo, é notável que PVHIV sem estarem sob TARV também apresentaram alta prevalência de osteopenia (BROWN; QAQISH, 2006). Isso sugere que a perda da densidade mineral óssea pode ser afetada por viremia não controlada, provavelmente pelos efeitos do

sistema imune no remodelamento ósseo, similar ao que ocorre durante a osteoporose pós-menopausa, resultado da desregulação imune associado ao persistente estado inflamatório (D'AMELIO et al., 2008; WEITZMAN; PACIFICI, 2006). Tem sido demonstrado também que proteínas do HIV são capazes de induzir atividade osteoclástica promovendo apoptose de osteoblastos (FAKRUDDIN; LAURENCE, 2005; GIBELLINI et al., 2008).

Indivíduos HIV positivos tem elevado risco para o desenvolvimento de numerosos cânceres, com 50% mais risco que em pessoas soronegativas (SHIELS et al., 2009; YANIK; KATKI; ENGELS, 2016). Em soronegativos os cânceres mais frequentemente diagnosticados são associados tipicamente com a idade como câncer de pulmão, próstata, colorretal, mama e linfoma não-Hodgkin (INCA, 2018). O risco para câncer de pulmão e linfoma não-Hodgkin podem ser influenciados tanto pelo HIV como pela idade (HJALGRIM; ENGELS, 2008; KIRK et al., 2007). Provavelmente por causa do pobre controle de vírus oncogênicos, a infecção pelo HIV tem sido associada com aumento da incidência de vários cânceres relacionados com vírus, como Sarcoma de Kaposi (herpes vírus humano-8), linfomas (vírus Epstein-Barr), câncer anal (papilomavírus humano) e câncer de fígado (vírus da hepatite B e C) (GRULICH et al., 2007).

Este estudo buscou avaliar a contribuição de três moléculas bem conhecidas em suas funções imunorregulatórias, Antígeno Leucocitário Humano (HLA)-G, fator de transcrição *forkhead box* P3 (FOXP3) e Galectina-1 (Gal-1) - no processo inflamatório crônico da infecção pelo HIV e no desenvolvimento de comorbidades a partir disso.

1.2 HLA-G: ESTRUTURA E FUNÇÕES

O HLA-G é uma das moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) não clássicas Ib que foi descrito primeiramente em tecidos fetais durante a gravidez (GERAGHTY; KOLLER; ORR, 1987). Apresenta função imunorregulatória bem descrita incluindo supressão de resposta imune inata e adaptativa além de induzir tolerância (CAROSELLA et al., 2015).

Estruturalmente é um heterodímero com uma cadeia pesada composta por três domínios globulares ($\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$), uma região transmembrana e um domínio citoplasmático curto, associada a uma cadeia leve ($\beta 2$ -microglobulina) (AMIOT et al., 2011; AMIOT; VU; SAMSON, 2015; DONADI et al., 2011; ISHITANI; GERAGHTY, 1992). Essa estrutura confere capacidade do HLA-G formar dímeros a partir do estabelecimento de pontes dissulfeto entre resíduos de cisteína individuais nas posições 42 (Cys42-Cys42) e 147 (Cys42-Cys147) da cadeia pesada de HLA-G (AMIOT; VU; SAMSON, 2015; BOYSON et al., 2002). Os dímeros, por sua vez, fornecem uma maior afinidade a receptores levando a menor dissociação do que se fossem monômeros (AMIOT; VU; SAMSON, 2015; SHIROISHI et al., 2006).

O gene HLA-G está localizado no braço curto do cromossomo 6 na posição 6p21.2-21.3 entre o genes HLA-F e HLA-A (AMIOT; VU; SAMSON, 2015; KOLLER et al., 1989). Possui estrutura semelhante à de outros genes de HLA de classe I clássicas (Ia), porém com polimorfismo limitado (53 alelos) (IMGT, 2016). Apresenta sete íntrons e oito éxons (AMIOT; VU; SAMSON, 2015; DONADI et al., 2011).

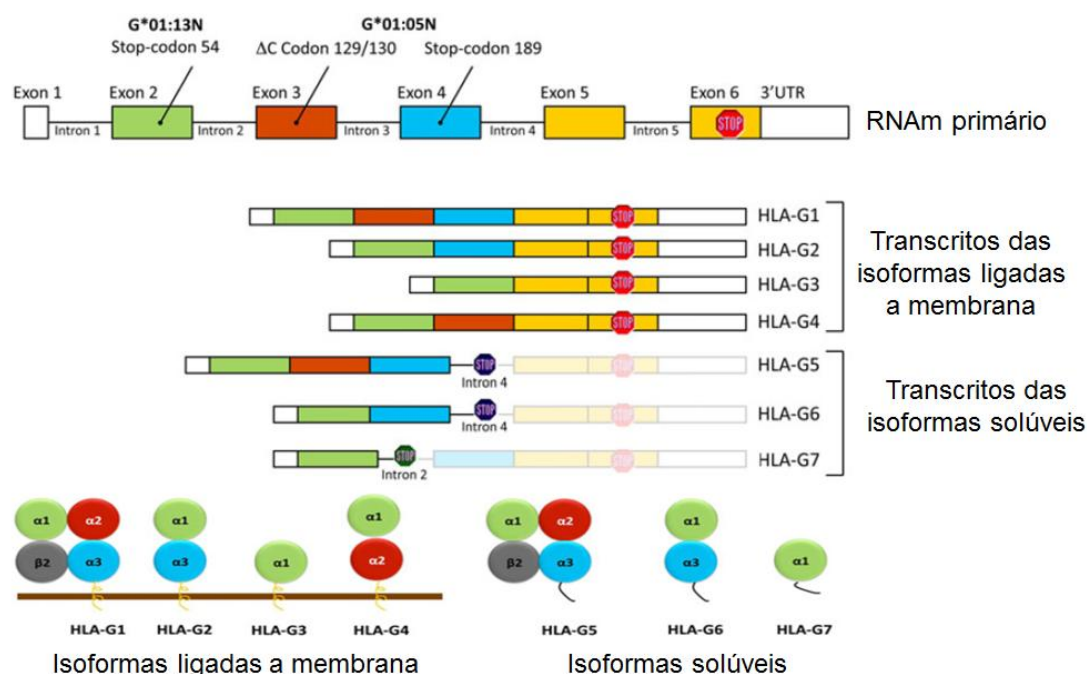
O éxon 1 codifica o peptídeo de sinal, enquanto que os éxons 2, 3 e 4 codificam os domínios extracelulares, $\alpha 1$, $\alpha 2$, e $\alpha 3$, de cadeia pesada, respectivamente. Os éxons 5 e 6, por sua vez, codificam os domínios transmembrana e citoplasmático e, por fim, o éxon 7, assim como o éxon 8, não estão presentes no RNA mensageiro (RNAm), devido à presença de um códon de parada no éxon 6 (DONADI et al., 2011).

O gene expressa uma proteína, que apresenta sete isoformas geradas por *splicing* alternativo do transcrito primário, sendo as isoformas HLA-G1, HLA-G2, HLA-G3, HLA-G4 ligadas à membrana e as isoformas solúveis HLA-G5, HLA-G6 e HLA-G7 (CAROSELLA et al., 2015; ISHITANI; GERAGHTY, 1992). A isoforma HLA-G1 ligada à membrana pode ser clivada proteolicamente por metaloproteinases gerando uma isoforma solúvel conhecida por “*shed*-HLA-G1” (DONG et al., 2003). A figura 2 mostra a estrutura gênica e as isoformas do HLA-G produzidas por *splicing* alternativo do RNAm primário.

Sua expressão em condições normais ou patológicas pode depender das regiões reguladoras do gene que são a região promotora 5' reguladora não traduzida (5'URR) e a região 3' não traduzida (3'UTR), além de fatores do microambiente (DONADI et al., 2011).

A região 3'UTR contém vários elementos reguladores pós-transcricionais, incluindo sítios polimórficos como o de Inserção (Ins)/Deleção (Del) de 14 pares de base (pb) (rs371194629) que podem influenciar na estabilidade do RNAm, volume, mobilidade e padrões de *splicing* (CAROSELLA et al., 2015). O genótipo Ins/Ins de 14 pb está associado com níveis reduzidos de RNAm e isoformas proteicas (HIBY et al., 1999; HVIID et al., 2003; RIZZO et al., 2012; TAN et al., 2007) e, por sua vez, os genótipos Del/Del e Del/Ins são responsáveis por uma maior produção das isoformas de HLA-G solúvel (sHLA-G) (LAARIBI et al., 2015; RIZZO et al., 2012).

Figura 2 - Isoformas do HLA-G produzidas por *splicing* alternativo do RNAm primário



Fonte: Adaptada de DONADI et al., 2011

A expressão do HLA-G, em condições fisiológicas, é restrita aos tecidos fetais (células amnióticas, precursores eritróides e citotrofoblastos) (KOVATS et al., 1990) e na fase adulta em sítios imunológicos privilegiados incluindo córnea (LE DISCORDE et al., 2003), timo (MALLET et al., 1999), ilhotas pancreáticas (CIRULLI et al., 2006), células endoteliais precursoras e eritroblastos (MENIER et al., 2004).

Contudo, sua expressão também pode ser induzida em condições patofisiológicas como, por exemplo, em transplantes (LILA et al., 2000), quadros clínicos de câncer (PAUL et al., 1998), doenças autoimunes (WIENDL et al., 2005), doenças inflamatórias (ARACTINGI et al., 2001; KHOSROTEHRANI et al., 2001), infecções virais (LAFON et al., 2005;

LOZANO et al., 2002) e infecções bacterianas (BORTOLOTTI et al., 2015; OLIVEIRA SOUZA et al., 2016).

As funções imunorregulatórias do HLA-G, descritas esquematicamente na figura 3, são desencadeadas a partir da interação com os seguintes receptores: ILT2, ILT4, CD8, CD160 e KIR2DL4 (CAROSELLA et al., 2015). ILT2 e ILT4 são os principais receptores nas células imunes periféricas sendo ILT2 expresso em monócitos, células dendríticas, células B e subpopulações de células NK e T; e ILT4 expresso quase exclusivamente em células de linhagem mielomonocítica (COLONNA et al., 1997; COLONNA et al., 1998). O ILT2 reconhece preferencialmente isoformas diméricas do HLA-G ligadas à membrana e ILT4 a isoforma dimérica solúvel do HLA-G1 e o HLA-G5 (GONEN-GROSS et al., 2005; SHIROISHI, et al., 2006) mas também reconhecem as isoformas HLA-G2 e HLA-G6 (HOWANGYIN et al., 2012).

Os receptores CD8 e CD160 interagem com sHLA-G promovendo apoptose de células T CD8⁺ (CONTINI et al., 2003) e células endoteliais (MAEDA et al., 2005; TSUJIMURA et al., 2006) que os expressam, respectivamente. Já a interação do receptor KIR2DL4 expresso em células NK da decídua com sHLA-G, induz a secreção de fatores pró-inflamatórios e pró-angiogênicos necessários para o crescimento vascular uterino nas primeiras semanas de gestação (RAJAGOPALAN; LONG, 2012a; RAJAGOPALAN; LONG, 2012b).

Via interação com ILT2, o HLA-G presente nas células-alvo (trofoblastos, tumores e linhagens celulares transfectadas) ou presentes no microambiente na isoforma HLA-G5, inibe a ação citolítica das células NK, protegendo as células que expressam HLA-G, um efeito conhecido como “efeito escudo” do HLA-G (CAROSELLA et al., 2001). Além disso, altera a secreção de IFN- γ pelas células NK, diminuindo a expressão de receptores de quimiocina e modulando a quimiotaxia no sangue periférico (MORANDI et al., 2011). Como resposta dessa interação inibe a proliferação de células T CD4⁺ (LILA et al., 2001; RITEAU et al., 1999); a função citolítica das células T CD8⁺ (LE GAL et al., 1999); induz a troca do perfil de expressão de citocinas para Th2 com produção de TNF- α , IFN- γ e IL-10 (KANAI et al., 2001a; KANAI et al., 2001b; KANAI et al., 2003;); induz a diferenciação de células T CD4⁺ e CD8⁺ em várias subpopulações de células Treg (CAROSELLA et al., 2015); inibe a proliferação de linfócitos T γ/δ ao produzir INF- γ e inibe a função citolítica de resposta à células de melanoma (LESPORT et al., 2011) importante no contexto da imunoterapia

antitumoral baseada nesses linfócitos, cuja eficácia pode ser aumentada ao bloquear a expressão e função do HLA-G. Presente também em células B, a interação de ILT2 com HLA-G inibe a proliferação, diferenciação e secreção de anticorpos pelas células B ativadas (NAJI et al., 2014).

Via interação com ILT4 o HLA-G inibe a função fagocítica dos neutrófilos e prejudica a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (CAROSELLA et al., 2015). Além disso, a degranulação de neutrófilos induzida pelo estímulo inflamatório aumenta a expressão de ILT4, consequentemente a inibição da função fagocítica de neutrófilos mediada pelo HLA-G é aumentada. (CAROSELLA et al., 2015). Esses mecanismos revelam um mecanismo único de regulação das funções de neutrófilos via HLA-G/ILT4 que pode ter implicações em desordens inflamatórias.

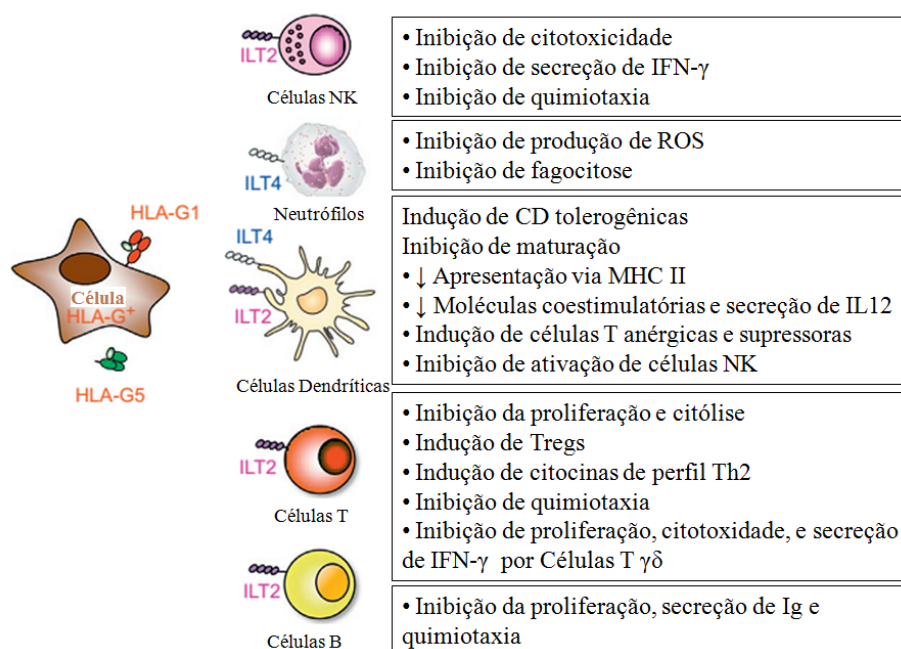
Foi descrito também que a interação ILT4/HLA-G prejudica a maturação de células dendríticas, atrasando rejeição de enxerto (LIANG; BAIBAKOV; HORUZSKO, 2002) e inibindo a expressão de MHCII e outras moléculas correceptoras como CD80 e CD86 em resposta ao LPS ou sinais aloativadores (GROS et al., 2008; HUANG et al., 2010; RISTICH et al., 2007). Assim, a função do HLA-G em células apresentadoras de antígeno (APCs) mielóides é de inibir suas atuações ou diferenciações, diminuindo a capacidade de ativar linfócitos. Pode também induzir diferenciação para células dendríticas supressoras e tolerogênicas caracterizadas pela alta expressão de HLA-G1 ligado à membrana, e de receptores ILT2, ILT3 e ILT4 (AMODIO et al., 2013; AMODIO et al., 2015; AMODIO; GREGORI, 2012; GREGORI et al., 2010).

As funções imunorregulatórias do HLA-G podem ser atuantes por meio do mecanismo de ação trogocitose que corresponde à rápida transferência de fragmentos de membrana e suas moléculas associadas durante contato intercelular (JOLY; HUDRISIER, 2003). Seus principais parâmetros são o contato célula-célula com formação de sinapse imunológica e a cinética rápida de transferência antigênica que leva poucos minutos (LEMAOULT et al., 2007).

As moléculas adquiridas permanecem na superfície da nova célula hospedeira por tempo limitado, mas ainda assim funcionais. Dessa forma, a célula pode usar temporariamente proteínas que ela não expressava constitutivamente. Foi demonstrado que fragmentos de

membrana com HLA-G podem ser transferidos via trogocitose de APCs para linfócitos T (HSU; NANAN, 2014; LEMAOULT et al., 2007; MONSIVAIS-URENDA et al., 2011), de células tumorais para células NK ativadas (CAUMARTIN et al., 2007) ou monócitos (ALEGRE et al., 2010; HOWANGYIN et al., 2010), e entre monócitos autólogos (ALEGRE et al., 2010). Como o HLA-G transferido permanece funcional, as células que o adquirem, ganham a capacidade de inibir outras células efetoras imunológicas (BROWN et al., 2012; CAUMARTIN et al., 2007; LEMAOULT et al., 2007), constituindo um mecanismo de regulação imune, capaz de mudar o desfecho de uma resposta imune.

Figura 3 - Funções imunorregulatórias do HLA-G



Fonte: Adaptada de CAROSELLA et al., 2015

Com essas propriedades imunorregulatórias, o HLA-G tem sido reconhecido como uma molécula tolerogênica cuja regulação positiva pode proteger ou prejudicar o indivíduo. A proteção foi relatada em casos de sucesso da aceitação de transplante (BIEDRON et al., 2015); na implantação do embrião no início da gestação (CLARK; SCHUST, 2013); e na evolução clínica de doenças autoimune e inflamatórias cuja progressão ocorre de maneira mais lenta (MURDACA et al., 2016, ZAHEDNASAB; KARAMPOOR, 2016). Já os prejuízos são descritos na infecção pelo HIV-1 (VIGANO et al., 2017), pelo vírus da hepatite C (AMIOT et al., 2014), na infecção bacteriana por *Helicobacter pylori* (SOUZA et al., 2016) e, em diferentes níveis de expressão em doenças cancerígenas tais como

glioblastoma, mieloma múltiplo, carcinoma de ovário, leucemia linfocítica e câncer de pulmão (PISTOIA et al., 2007).

1.3 FATOR DE TRANSCRIÇÃO FOXP3: ESTRUTURA E FUNÇÕES

O fator de transcrição FOXP3, codificado pelo gene regulador FOXP3, foi relacionado com a atividade reguladora de células Tregs CD4+CD25+, apontando que a perda de expressão ou a existência de polimorfismos desse fator contribuem para diminuir ou alterar a funcionalidade dessas células (WALKER et al., 2003).

As células Tregs constituem uma subpopulação de células T que atuam nos mecanismos de tolerância imunológica. São moduladores essenciais na resposta imune a patógenos, alérgenos, células cancerígenas e antígenos próprios ao induzirem supressão de células T efectoras, bloqueando sua ativação e função (COFFER; BURGERING, 2004). Deficiência no desenvolvimento ou na função dessas células tem sido associada com doenças autoimunes, rejeição de transplantes e doenças inflamatórias intestinais (MALOY; POWRIE, 2001; SHEVACH, 2002).

Atualmente, células Tregs são amplamente reconhecidas como uma subpopulação de células T CD4+CD25+FOXP3+ capazes de suprimir a ativação, proliferação e função de uma ampla variedade de células imunes efectoras, incluindo células T CD4+, T CD8+, células NK, células B e células apresentadoras de antígenos como células dendríticas e macrófagos (SHEVACH, 2009; RUDENSKY, 2011).

O gene FOXP3 foi identificado em 2001 como o gene causador de desenvolvimento espontâneo de severa autoimunidade/inflamação resultante da mutação de um único gene do cromossomo X em ratos *Scurfy* (BRUNKOW et al., 2001). O gene FOXP3 em humanos possui 1296 pb de tamanho com 11 diferentes éxons. Esse gene é localizado no braço curto do cromossomo X (Xp11.23), está sujeito à inativação do cromossomo X e codifica 431 proteínas (FONTENOT et al., 2005; GAMBINERI; TORGERSON; OCHS, 2003).

Sequenciamentos deste gene revelaram a existência de três regiões altamente conservadas no *locus* do FOXP3, sendo todas elas sujeitas às modificações epigenéticas e envolvidas na regulação da transcrição do FOXP3 (HUEHN; POLANSKY; HAMANN,

2009). Uma dessas regiões é a região promotora, localizada 6,5 kb acima do primeiro éxon codificador do FOXP3. Essa região promotora é uma clássica sequência de bases nitrogenadas Timina (T) Adenina (A) e Citosina (C), TATA CAAT, sendo ativada em resposta à sinalização do receptor de células T (TCR) por meio da ligação dos fatores de transcrição, fator nuclear de linfócitos T ativado (NFAT) e proteína ativadora 1 (AP-1) (MANTEL et al., 2006).

Polimorfismos na região promotora do gene FOXP3 podem potencializar alterações na expressão gênica mudando a especificidade de ligação dos fatores de transcrição aos seus locais de ligação e mudando a cinética de iniciação de transcrição (HANEL et al., 2011). Existem cinco polimorfismos de único nucleotídeo (SNP) na região promotora do FOXP3: -924A/G (rs2232365), -1383C/T (rs2232364), -2383C/T (rs3761549), -3279C/A (rs3761548) e -3499A/G (rs3761547) (BASSUNY et al., 2003). Até o presente momento existem apenas estudos relacionando esses polimorfismos com infertilidade idiopática, endometriose, doenças autoimunes e alguns tipos de cânceres (ODA et al., 2013).

1.4 GAL-1: ESTRUTURA E FUNÇÕES

A Gal-1 pertence a uma família de proteínas, “*Glycan-binding proteins*”, que ligam de modo específico as glicanas (ARTHUR et al., 2015; BARONDES et al., 1994a). Esta família é composta por 15 membros agrupados de acordo com a conservação de resíduos de aminoácidos no domínio de reconhecimento de carboidratos, *Carbohydrate recognition domain* (CRD) e a afinidade por β -galactosídeos (LEFFLER et al., 2004). Essas proteínas são multifuncionais e apresentam atividades intra e extracelulares (STOWEEL; CUMMINGS, 2014).

O gene da Gal-1 humana, denominado *Lectin galactoside-binding soluble 1* – (LGALS1), está localizado no cromossomo 22q12 e é constituído por 4 éxons e 3 íntrons totalizando 4397pb, sendo descrito como altamente conservado e com poucos polimorfismos (CHIARIOTTI et al., 2004). A Gal-1 é uma proteína ácida constituída por N-terminal acetilado, ausência de peptídeo sinal e presença de resíduos de cisteínas livres (LEFFLER et al., 2004; RABINOVICH, 2005). Pode formar homodímeros, associados de modo não-covalente, classificando-a como prototípica na família das galectinas (BARONDES et al., 1994b; CAMBY et al., 2006; CHIARIOTTI et al., 2004).

No sistema imunológico, Gal-1 é sintetizada e secretada por uma variedade de células, incluindo linfócitos T e B ativados (FUERTES et al., 2004; ZÚÑIGA et al., 2001a), macrófagos (RABINOVICH et al., 1996), Treg FOXP3+ (GARÍN et al., 2007), células dendríticas tolerogênicas (ILARREGUI et al., 2009), linfócitos T γ/δ (RUTKOWSKI et al., 2015), micróglia (STAROSSOM et al., 2012) e células supressoras mielocíticas (RUTKOWSKI et al., 2015).

Sua expressão é proeminente em sítios imunológicos privilegiados, como placenta (BLOIS et al., 2007; RAMHORST et al., 2012), testículos (DETTIN et al., 2003; PÉREZ et al., 2015), olho (RIDANO et al., 2017), e estão significativamente aumentados ou diminuídos em condições inflamatórias: infecções microbianas (DAVICINO et al., 2017; PONCINI et al., 2015; SURYAWANSHI et al., 2013), autoimunidade (SANTUCCI et al., 2003), alergia (GE et al., 2016; XIE et al., 2017), câncer (CROCI et al., 2012; CROCI et al., 2014; MARTÍNEZ-BOSCH et al., 2014; RUBINSTEIN et al., 2004; RUTKOWSKI et al., 2015), desordens reprodutivas (BASTÓN et al., 2014; BLOIS et al., 2007; BLOIS et al., 2014; RAMHORST et al., 2012), doenças neurodegenerativas (STAROSSOM et al., 2012) e infarto do miocárdio (SEROPIAN et al., 2013). Diante dessas especificidades, estudos tem buscado discutir e desenvolver seu potencial terapêutico em uma ampla variedade de condições fisiológicas e patológicas.

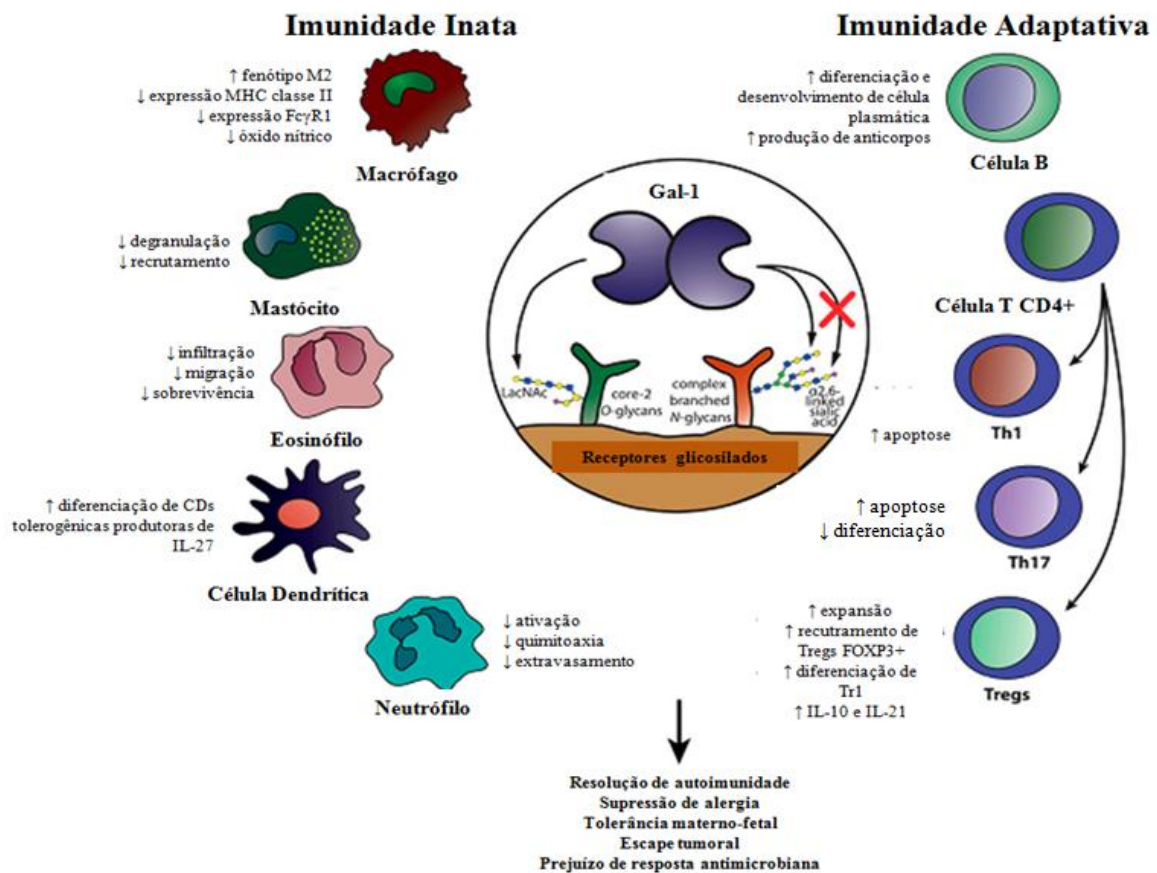
A imunorregulação do sistema imune inato e adaptativo mediada pela Gal-1 é desencadeada pelo reconhecimento de receptores glicosilados na superfície de diversas células, como os receptores CD43, CD45, CD69, pré-receptor de células B (pre-BCR) e fator de crescimento vascular endotelial R2 (BONZI et al., 2015; CROCI et al., 2014; DE LA FUENTE et al., 2014; THIEMANN; BAUM, 2016). A sensibilidade de ligação da Gal-1 a esses receptores depende da dinâmica de glicosilação nos receptores. Enquanto a presença de N-acetil-lactosaminas (LacNAc) em ramificações de N- ou O-glicanas favorecem a ligação, a presença de ácido siálico bloqueia a ligação e função da Gal-1 (Figura 4) (CERLIANI et al., 2017).

Gal-1 promove a resolução de inflamação aguda modulando o fenótipo e a função de células do sistema imune inato. Tem sido demonstrado que Gal-1 inibe ativação, quimiotaxia e extravasamento de neutrófilos (COOPER; NORLING; PERRETTI, 2008); transforma

macrófagos para fenótipo resolutivo M2 ao inibir expressão de MHC de classe II, FcγR1 e diminuir liberação de óxido nítrico (BARRIONUEVO et al., 2007; ZÚÑIGA et al., 2001b); auxilia na diferenciação de células dendríticas tolerogênicas produtoras de IL-27 (ILARREGUI et al., 2009); inibe recrutamento e degranulação de mastócitos (ARTHUR et al., 2015); e inibe infiltração, migração e sobrevivência de eosinófilos (ARTHUR et al., 2015).

Na resposta imune adaptativa, Gal-1 promove apoptose e diminui diferenciação de linfócitos Th1 e Th17 além de facilitar circuitos tolerogênicos mediados pela expansão e recrutamento de Tregs FOXP3+, Tregs FOXP3- (Tr1), aumentando produção de IL-10 e IL-21 (ARTHUR et al., 2015; SUNDBLAD et al., 2017). Adicionalmente, Gal-1 favorece desenvolvimento de células B, diferenciação e sobrevivência de células plasmáticas e aumento da produção de anticorpos (ANGINOT et al., 2013; TABRIZI et al. 2009).

Figura 4 - Funções imunorregulatórias da Gal-1



Fonte: Adaptada de SUNDBLAD et al., 2017

Esses mecanismos regulatórios, descritos esquematicamente na figura 4, estão sendo relacionados com efeitos benéficos como resolução de autoimunidade e alergias, tolerância na interface materno-fetal e efeitos prejudiciais ao indivíduo como o favorecimento do escape imunológico de células tumorais e o comprometimento de respostas antimicrobianas efetivas (SUNDBLAD et al., 2017).

1.5 MOLÉCULAS IMUNORREGULATÓRIAS E A INFECÇÃO PELO HIV

As moléculas HLA-G, Gal-1 e o fator de transcrição FOXP3 regulam a atuação do sistema imune conferindo tolerância, suprimindo respostas efectoras e controlando a resposta inflamatória exacerbada. Sabe-se que processos inflamatórios exacerbados podem desencadear diversas patologias como aterosclerose, asma, fibrose e doenças metabólicas (NATHAN; DING, 2010). A infecção pelo HIV tornou-se uma doença crônica e estudos são necessários para entender os mecanismos que contribuem para o estado de inflamação persistente que as PVHIV apresentam e os possíveis impactos na saúde desses indivíduos (NASI et al., 2016).

O HIV possui estratégias que podem tornar células infectadas indetectáveis pelo sistema imunológico do organismo. Para escapar da resposta de linfócitos T citotóxicos (CTL), o HIV inibe a expressão de moléculas do MHC de classe I na superfície celular, responsáveis pela apresentação de antígenos virais aos CTL, pela atuação da proteína viral Nef (TRIPATHI; AGRAWAL, 2007).

Embora não se conheça exatamente os mecanismos envolvidos, a proteína Nef pode estar relacionada ao se ligar na cauda citoplasmática da molécula do MHC de classe I, interrompendo o tráfego para a superfície celular (WILLIAMS et al., 2002). Devido à cauda citoplasmática truncada da molécula HLA-G, a proteína Nef não consegue ativar as vias de regulação negativa para o HLA-G, permitindo a sua contínua expressão na superfície celular durante a infecção pelo HIV (TRIPATHI; AGRAWAL, 2007). Além disso, o HIV regula positivamente a expressão de HLA-G pelo aumento da produção de IL-10 durante a infecção (MOREAU et al., 1999). Uma vez expresso, o HLA-G pode interagir com o sistema imune ao ligar-se com receptores inibitórios inibindo ações efectoras de células T e NK contra o HIV (CAROSELLA et al., 2015).

O sítio polimórfico de Ins/Del de 14 pb na região 3'UTR influencia na expressão de HLA-G (ALBUQUERQUE et al., 2016; DONADI et al., 2011). Para o HIV-1, o polimorfismo dessa região tem sido associado com transmissão vertical materno fetal (HONG et al., 2015). Fabris e colaboradores (2009) relacionaram o genótipo Del/Del com efeito protetor na transmissão perinatal do HIV-1 no Brasil. Entretanto, Segat e colaboradores (2014) associaram o genótipo de inserção (Ins/Ins ou Ins/Del) com efeito protetor na transmissão intrauterina e durante o parto em crianças da Zâmbia.

Larson e colaboradores (2013) avaliaram o impacto desse polimorfismo na progressão da infecção pelo HIV-1 e sobrevivência em indivíduos não tratados com TARV. O genótipo Del/Del foi associado com elevados níveis de carga viral, baixas contagem de linfócitos T CD4+ e aumento da mortalidade, quando comparados com genótipo de inserção dos 14 pb (LARSON et al., 2013). Ainda não existem estudos que avaliem as variações genótípicas desse polimorfismo relacionando com o estado inflamatório crônico e consequentemente comorbidades em PVHIV sob TARV.

Em relação à expressão do HLA-G na progressão da infecção pelo HIV-1, Derrien e colaboradores (2004) demonstraram em experimentos *in vitro* que durante a infecção aguda a isoforma HLA-G1 de membrana estava suprimida em monócitos. Contudo, em estágios mais tardios foi observado aumento da expressão de HLA-G na superfície de monócitos periféricos de pacientes sob TARV quando comparados com PVHIV sem TARV (CABELLO et al., 2003).

Em concordância, estudos observaram aumento da expressão de HLA-G na superfície de monócitos e expansão da população de linfócitos T CD8+ HLA-G+ em PVHIV sob TARV ou não quando comparados com controles saudáveis (LOZANO et al., 2002; LOZANO et al., 2009). Assim como nos controles, a população de linfócito T CD8+ HLA-G+ *naive* foi maioria, porém apenas nos pacientes foram detectados fenótipos efetores nos linfócitos T CD8+ HLA-G+ (LOZANO et al., 2009). Em estudo mais recente, células T CD8+ HLA-G+ foram considerados diretamente proporcionais à contagem de células T CD4+ e inversamente à contagem de carga viral em pacientes sem TARV, correlacionando expansão dessas células com perfil de melhor controle da doença (VIGANÒ et al., 2017).

Sobre a expressão das formas solúveis do HLA-G, Donaghy e colaboradores (2006) observaram níveis elevados de sHLA-G em infectados pelo HIV-1, podendo estar relacionados com a progressão da patogênese do HIV através da indução de tolerância. Adicionalmente, infecções progressivas, sem TARV, foram associadas com elevados níveis de sHLA-G circulantes secretados em parte por monócitos e células dendríticas para regulação autócrina de suas funções (HUANG et al., 2010).

Em concordância estudos mostraram que os níveis de sHLA-G elevados em PVHIV antes da TARV diminuíram após adesão à terapia (LAJOIE et al., 2009; MURDACA et al., 2009), tendo ao mesmo tempo diminuição da carga viral, aumento da contagem de células T CD4+ e queda na contagem de células T CD8+ (MURDACA et al., 2009). Posteriormente, foram observados níveis mais elevados de sHLA-G em PVHIV com doenças infecciosas oportunistas e neoplasia, sugerindo que essas condições podem acentuar a produção dessa molécula solúvel tornando-a um possível marcador para monitorar resposta virológica e reconstituição imune em PVHIV (MURDACA et al., 2011). Além disso, Li e colaboradores (2013) demonstraram a importância das células Tregs HLA-G+ no balanceamento da ativação da resposta imune e a ação antirretroviral dessa resposta durante a infecção pelo HIV-1. Esses resultados sugeriram que a perda dessas células pode contribuir com a desregulação da resposta imune e a progressão da infecção pelo HIV-1.

Células Tregs desempenham importantes funções no curso da infecção pelo HIV, que podem ser benéficas ou prejudiciais para o hospedeiro (IMAMICHI; LANE, 2012). Essas células regulam o sistema imune, seus processos inflamatórios e a expansão do vírus no organismo ao suprimir células T ativadas (IMAMICHI; LANE, 2012; KLEINMAN et al., 2018). Entretanto, supressão dessa resposta ativada também limita a eliminação do vírus e promove formação de reservatórios virais no organismo, uma vez que as próprias Tregs podem ser alvos diretos do HIV abrindo espaço desse reservatório viral (HOLMES et al., 2008; KLEINMAN et al., 2018)

O FOXP3 é um importante marcador de células Tregs. Os polimorfismos de alta frequência em seu gene que afetam a produção dessa molécula, têm sido associados com diversas doenças humanas multifatoriais como doenças autoimunes e cânceres podendo resultar em deficiência ou produção aumentada de Tregs (ODA et al., 2013). Ainda não existem estudos que relacionem seus polimorfismos com infecção pelo HIV. Uma vez que

este fator de transcrição desempenha importante função na patogenia e prognóstico da infecção, estudos que busquem essas relações tornam-se promissores.

A molécula imunorregulatória Gal-1 pode estar significativamente aumentada ou diminuída em condições inflamatórias (ARTHUR et al., 2015). Em relação ao HIV-1, ela tem sido relacionada com aumento da capacidade infecciosa do vírus ao acelerar o processo de ligação e adesão do vírus às células-alvo (ST-PIERRE et al., 2011).

Foi demonstrado que a Gal-1 se liga ao vírus reconhecendo N-glicanas na gp120 do envelope viral e estudos sugerem a ligação preferencial da Gal-1 ao receptor alvo CD4 da gp120 viral (ST-PIERRE et al., 2011). Juntos, esses resultados sugerem que o HIV-1 explora Gal-1 para aumentar a interação gp120-CD4 acelerando a cinética de ligação do HIV-1 à superfície da célula-alvo de forma a aumentar a infectividade do vírus (ST-PIERRE et al., 2011).

Investigações dos mecanismos imunorregulatórios na infecção pelo HIV-1 podem ser importantes no estabelecimento de novos biomarcadores para diagnóstico e prognóstico, no encontro de novos alvos terapêuticos, na prevenção da transmissão, no desenvolvimento de imunoterapias e desfechos para cura da infecção (KLEIMAN et al., 2018; ST-PIERRE et al., 2011; VASIREDDI, 2017).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o impacto dos polimorfismos gênicos do HLA-G e FOXP3 e a expressão das formas solúveis de HLA-G e Gal-1 no desenvolvimento de comorbidades em PVHIV.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar os prontuários de pacientes para obtenção das características clínicas, laboratoriais e de tratamento, assim como, determinar as comorbidades resultantes da infecção pelo HIV.
- Avaliar o polimorfismo Ins/Del de 14 pb na região 3'UTR do gene HLA-G;
- Avaliar o SNP -2383 C/T na região promotora do fator de transcrição FOXP3;
- Avaliar a expressão da forma solúvel das moléculas imunorregulatórias HLA-G e Gal-1;
- Associar os genótipos do HLA-G e FOXP3 e a expressão solúvel de HLA-G e Gal-1 com os achados clínicos, laboratoriais e de tratamento das PVHIV, avaliando riscos das mesmas desenvolverem comorbidades.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DESENHO DO ESTUDO

O presente trabalho foi um estudo analítico, observacional, longitudinal do tipo caso-controle. Os participantes da pesquisa foram separados em grupo de pacientes, pessoas que vivem com HIV (PVHIV) tendo desenvolvido ou não comorbidades após o diagnóstico da infecção, e em grupo controle, pessoas não infectadas pelo HIV e que também não desenvolveram comorbidades até o momento da pesquisa. Amostras de sangue coletadas de ambos os grupos foram submetidas à genotipagem do polimorfismo Ins/Del de 14 pb na região 3'UTR do gene HLA-G e do SNP -2383 C/T na região promotora do fator de transcrição FOXP3, seguidas de dosagens das moléculas solúveis HLA-G e Gal-1 para posterior comparação entre os grupos na determinação de influência dessas moléculas e fator de transcrição na evolução clínica das PVHIV.

3.2 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto dessa pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) com o parecer nº 1.871.107/2016 (ANEXO A). Para a efetivação do estudo, as coletas das amostras de sangue e análise dos prontuários dos pacientes foram realizadas mediante aceite por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Pacientes (ANEXO B). Da mesma forma, as coletas das amostras de sangue do grupo controle foram feitas mediante aceite por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Controles (ANEXO C).

3.3 COLETA DAS AMOSTRAS

3.3.1 Local da coleta, critérios de inclusão e exclusão

Para a realização das pesquisas foram recrutadas 200 PVHIV, de ambos os sexos e com idade igual ou superior a dezoito anos, acompanhados pelo Centro de Referência e Tratamento (CRT) IST/AIDS do município de Vitória no Espírito Santo. Foram incluídos no

estudo pacientes que vivem com HIV, excluindo aqueles com outras coinfeções virais crônicas como Hepatite B ou C.

O grupo controle foi composto por 200 doadores voluntários de sangue e medula óssea, do Hemocentro do Espírito Santo (HEMOES) em Vitória, de ambos os sexos e com idade igual ou superior a dezoito anos, pareados aos pacientes em termos de sexo e idade. Os doadores foram escolhidos conforme critérios adotados pelo HEMOES configurando-os como aptos para doação de sangue e medula óssea, os quais incluem critérios que os tornaram aptos a participar deste estudo que são: não estejam infectados pelo HIV e outras IST; não apresentam história de comorbidades de origem metabólica, neurocognitiva, óssea, cardiovascular, câncer, autoimune/inflamatória, renal, hepática; e não vivam com doenças infecciosas cuja transmissibilidade pela transfusão sanguínea seja conhecida. As coletas dos grupos de pacientes e controles foram realizadas no período entre Janeiro e Maio de 2017.

3.3.2 Obtenção do sangue total, plasma e soro

O sangue total dos participantes foi colhido por punção venosa pelos profissionais habilitados do CRT IST/AIDS e do HEMOES, utilizando-se dois tubos à vácuo com anticoagulante EDTA e um tubo sem anticoagulante para obtenção do soro para cada paciente e indivíduo controle. Cada tubo comporta 4 mL de sangue total, sendo portanto colhidos 12 mL para cada paciente e controle.

Para separação e obtenção de plasma e soro, os tubos foram centrifugados a 3500 rpm por 10 minutos a 4°C. O plasma e soro obtidos foram separados em alíquotas e armazenados em microtubos *eppendorf* dentro de caixas identificadas por códigos, que foram mantidas em freezer à -80°C, constituindo um biorrepositório aprovado pelo departamento de Ciências Farmacêuticas da UFES.

3.4 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA

A extração de DNA foi realizada pela adaptação do método *salting out* descrito por Miller, Dykes e Polesky (1988). O método requer uso de soluções para lise de hemácias e leucócitos. A solução de lise de hemácias é composta por sacarose, solução de MgCl₂, solução

de Tris-base e TRITON X-100. Por sua vez, a solução de lise de leucócitos é preparada a partir de NaCl e NaEDTA 0,024 M.

O sangue total coletado nos tubos com EDTA foi transferido para tubos *falcon* de 50 mL devidamente identificados. Adicionou-se o tampão de lise de hemácias até completar 40 mL tendo o mesmo peso do seu contrapeso correspondente. Foi então homogeneizado por 10 segundos vigorosamente em agitador de tubos vórtex. Os tubos foram centrifugados a 3200 rpm, por 5 minutos, à 4°C. Em seguida o sobrenadante foi descartado cuidadosamente por inversão sem desfazer o *pellet* obtido.

A seguir, foram adicionados aos tubos 4,5 mL da solução de lise de leucócitos, 125 µL de SDS 10%, para eliminação de proteínas e 1,1 mL de perclorato de sódio 5M a fim de se obter o DNA. Os tubos foram homogeneizados vigorosamente em agitador de tubos vórtex. Adicionou-se 2 mL de solução de NaCl 4M, misturando a solução no vórtex por 20 a 30 segundos. Os tubos foram centrifugados a 3100 rpm por 8 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante obtido foi transferido para outros tubos *falcon* 50 mL identificados, tomando cuidado para não transferir o *pellet*.

Nesses novos tubos foram adicionados 5 mL de isopropanol estocado previamente em freezer -20°C. A solução obtida foi homogeneizada cuidadosamente manualmente até a precipitação visível do DNA. O DNA obtido foi transferido com auxílio de uma ponteira estéril para tubo *ependorf* de 2 mL contendo 1 mL de etanol 70%. Os *ependorfs* foram centrifugados a 5000 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente para lavagem. O sobrenadante final foi descartado. O *pellet* de DNA extraído foi mantido *overnight* à temperatura ambiente para secagem. Para hidratação, foram adicionadas 200 µL de água ultrapura estéril e as amostras de DNA obtidas foram armazenadas em freezer -20°C constituído um banco de amostras biológicas.

A quantificação e determinação de pureza do DNA obtido em cada amostra foram realizadas usando o aparelho Epoch®, do Laboratório Multiusuário do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCFAR), no qual, pipetou-se 2 µL da solução de DNA com água ultrapura. Os dados obtidos foram compilados para cálculos de correção de concentração necessários para obter a quantidade ideal para a amplificação.

3.5 ANÁLISE DE PRONTUÁRIOS

A análise dos prontuários dos pacientes ocorreu por busca ativa dos dados clínicos e laboratoriais relevantes para a pesquisa. A fim de traçar perfil clínico dos participantes da pesquisa foram coletados os seguintes dados: sexo, categoria de exposição (heterossexual, bissexual, homossexual, transmissão vertical e não declarado), idade na coleta, tempo de infecção, carga viral (indetectável e valores detectáveis), contagem de células CD4, terapia medicamentosa (sob TARV ou não) e comorbidades desenvolvidas após infecção pelo HIV. As comorbidades foram categorizadas em desordens conforme perfil das doenças associadas: metabólica, neurocognitiva, ósseas, cardiovasculares, cânceres, autoimunes/inflamatórias, renal e hepática. Os dados foram compilados no programa *Microsoft® Excel®* 2013.

3.6 POLIMORFISMO INS/DEL DE 14 PB DO GENE HLA-G (rs371194629)

A avaliação do polimorfismo de Ins/Del de 14 pb do gene HLA-G foi feita através da reação em cadeia da polimerase (PCR), de acordo com o procedimento adaptado escrito por Laaribi e colaboradores (2015), contendo os iniciadores genéricos específicos direto HLAG8F-TGTGAAACAGCTGCCCTGTGT e reverso HLAG8R-GTCTTCCATTTATTTTGTCTCT.

Para a PCR foi utilizado o termociclador modelo 21000 ThermalCycler BIORAD (Foster City, CA, EUA), e os reagentes foram oligonucleotídeos, desoxirribonucleotídeos, tampão (15mM de MgCl₂, 500 mM de KCl, 100 mM de Tris HCl pH 8,4 e 1% de TritonX-100), MgCl₂ e Taq Polimerase *Platinum* todos das Invitrogen®.

As condições de amplificação, número de ciclos, concentração de reagentes e temperatura de anelamento foram padronizadas a fim de se obter um bom sinal de amplificação com o mínimo de inespecificidade. Em todos os conjuntos de reações de amplificação foi utilizado um tubo sem DNA (branco), funcionando como controle dos reagentes. As concentrações dos reagentes para a PCR estão descritos na tabela 1 e o perfil de ciclagem para amplificação na tabela 2.

Os produtos de amplificação foram submetidos à separação por eletroforese em condições desnaturantes, utilizando-se géis de poli-acrilamida 10%. A sopa primitiva de poli-acrilamida 10 % foi preparada a partir de acrilamida, bis-acrilamida, TBE 5x e água

destilada. Para obtenção do gel adicionou-se, à sopa primitiva 10%, persulfato de amônio e TEMED. Adicionou-se, ao produto da PCR, o corante azul de bromofenol para posterior aplicação no gel em cuba de eletroforese. Foi aplicado também no gel, o padrão de peso molecular de 100 pares de bases (pb) para marcação da corrida das bandas de interesse dos produtos da PCR. A eletroforese foi realizada durante 1 hora e 30 minutos, em voltagem de 250 V, em solução tampão apropriada.

Tabela 1 - Concentrações dos reagentes utilizados para a amplificação do polimorfismo Ins/Del de 14 pb do gene HLA-G

Reagente	Concentração	Quantidade (µL)
Água	-	19,4
Tampão	10 X	2,5
MgCl ₂	50 mM	0,4
DNTPs	10 mM	0,5
HLA8F	10 pmol/µL	0,5
HLA8R	10 pmol/µL	0,5
Taq Polimerase	1 U/µL	0,2
DNA	80 ng/µL	1,0
Volume final	-	25,0

MgCl₂: cloreto de magnésio; dNTP: 2'deoxinucleosídeo 5' trifosfato

Tabela 2 - Perfil de ciclagem da amplificação do polimorfismo Ins/Del de 14-pb do gene HLA-G

Estágio	Temperatura (°C)	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	94	4'	1x
Desnaturação	94	45''	34x
Pareamento	60	40''	
Extensão	72	45''	
Extensão final	72	7'	1x
	4	∞	

Após eletroforese, os géis foram retirados das placas de corrida e colocados em 50 mL de solução de fixação composta de etanol e ácido acético e mantidos em agitação por 15 minutos. Em seguida, foram corados com solução de nitrato de prata a 0,2%, mantidos em agitação à temperatura ambiente por 10 minutos. A solução corante então foi descartada e os géis foram lavados com água por 2 minutos. Após o descarte da água acrescentou-se 50 mL de solução de revelação, composta por NaOH e formaldeído, em cada gel, e mantidos em

agitação por 10 minutos, quando então se tornam visíveis as bandas de interesse para análise do polimorfismo. Produtos da PCR de 324 pb (Ins) e 310 pb (Del) de tamanho correspondem aos alelos inserção e deleção respectivamente. Os géis foram fotografados para registro dos resultados (Figura 5).

Figura 5 - Eletroforese em gel de poliacrilamida para detecção do polimorfismo Ins/Del de 14 pb do gene HLA-G



Legenda: PPM: padrão de peso molecular 100 pb; Genótipo Ins/Ins poço (1); Genótipo Del/Del poço (6); Genótipo Ins/Del poço (2; 3; 4; 5; 7; 8); B: Branco poço (9)

3.7 SNP -2383 C/T DO GENE FOXP3 (rs3761549)

A avaliação do SNP -2383 C/T do gene FOXP3 (rs3761549) foi feita pela adaptação do protocolo descrito por Gomes e colaboradores (2016) através de PCR com análise de fragmentos de restrição (PCR-RFLP), contendo os iniciadores genéricos específicos direto FOXP3-2383F-GCCTGGCACTCTCAGAGCTT e reverso FOXP3-2383R-GTCTGTGGAGGCTCCGAACA. Para a PCR foi utilizado termociclador modelo 21000 ThermalCycler BIORAD (Foster City, CA, EUA), e os reagentes foram oligonucleotídeos, desoxirribonucleotídeos, tampão 10x (15mM de $MgCl_2$, 500 mM de KCl, 100 mM de Tris HCl pH 8,4 e 1% de TritonX-100), $MgCl_2$ e Taq Polimerase 1 U/ μL todos das Invitrogen®.

As condições de amplificação, número de ciclos, concentração de reagentes e temperatura de anelamento foram padronizadas a fim de se obter boas condições de amplificação. Em todos os conjuntos de reações de amplificação foi utilizado um tubo sem

DNA (branco), funcionando como controle dos reagentes. As concentrações dos reagentes para a PCR estão descritos na tabela 3 e o perfil de ciclagem para amplificação na tabela 4.

Tabela 3 - Concentrações dos reagentes utilizados para a amplificação do SNP -2383 C/T do gene FOXP3

Reagente	Concentração	Quantidade (µL)
Água	-	19,125
Tampão	10 X	2,5
MgCl ₂	50 mM	0,75
dNTPs	10 mM	0,5
FOXP3-2383F	20 µM	0,5
FOXP3-2383R	20 µM	0,5
Taq Polimerase	1 U/µL	0,125
DNA	50 ng/µL	1,0
Volume final		25,0

MgCl₂: cloreto de magnésio; dNTP: 2' deoxinucleosídeo 5' trifosfato

O produto da PCR obtido com 943 pb de tamanho foi submetido a digestão pela enzima de restrição BseNI e seu tampão da Invitrogen®, nas quantidades descritas na Tabela 5, à temperatura de 65°C por 12 à 14 horas em banho seco. Os fragmentos obtidos após digestão foram submetidos à separação por eletroforese em condições desnaturantes, utilizando-se géis de poliacrilamida 8%. A sopa primitiva de poliacrilamida 8% foi preparada a partir de acrilamida, bis-acrilamida, TBE 5x e água destilada. Para obtenção do gel adicionou-se, à sopa primitiva 8%, persulfato de amônio e TEMED. Adicionou-se, ao produto da PCR-RFLP, o corante azul de bromofenol para posterior aplicação no gel em cuba de eletroforese. Foi aplicado também no gel o padrão de peso molecular de 100 pares de bases (pb) para marcação da corrida das bandas de interesse dos produtos da PCR. A eletroforese foi realizada durante 50 minutos, em voltagem de 230 V, em solução tampão apropriada.

Tabela 4 - Perfil de ciclagem da amplificação do SNP -2383 C/T do gene FOXP3

Estágio	Temperatura (°C)	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	94	5'	1x
Desnaturação	94	1'	
Pareamento	60	1'	32x
Extensão	72	1'	
Extensão final	72	10'	1x
	4	∞	

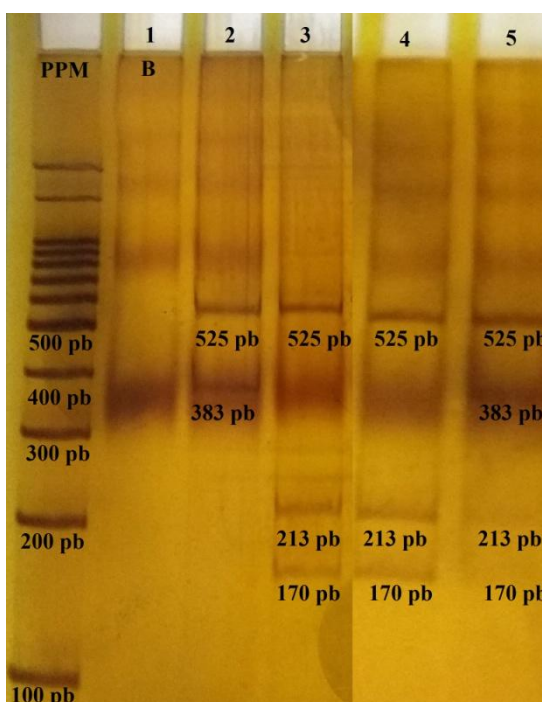
Tabela 5 - Concentrações dos reagentes utilizados na digestão do produto da PCR do SNP-2383 C/T do gene FOXP3

Reagentes	Quantidade (µL)
Tampão do BseNI	1,0
Enzima BseNI	0,5
Água	8,5
Produto da PCR	15,0
Volume total	25,0

Após eletroforese, os géis foram retirados das placas de corrida e colocados em 50 mL de solução de fixação composta de etanol e ácido acético e mantidos em agitação por 15 minutos. Em seguida, foram corados com solução de nitrato de prata a 0,2%, mantidos em agitação à temperatura ambiente por 10 minutos. A solução corante então foi descartada e os géis foram lavados com água por 2 minutos. Após o descarte da água acrescentou-se 50 mL de solução de revelação, composta por NaOH e formaldeído, em cada gel, e mantidos em agitação por 10 minutos, quando então se tornam visíveis as bandas de interesse para análise do polimorfismo. Os géis foram fotografados para registro dos resultados (Figura 6).

O perfil de bandas obtidas após digestão em 525 pb, 213 pb, 170 pb e 35 pb corresponde ao alelo C enquanto que o perfil em 525 pb, 383 pb e 35 pb ao alelo T. Na presença de todas as bandas considera-se genótipo C/T. A banda em 35 pb não está representada na figura 6 e não representa diagnóstico diferencial. O gene FOXP3 é ligado ao cromossomo X. Portanto, o diagnóstico para sexo masculino é dado com apenas um alelo: C ou T e para feminino o diagnóstico é dado com os dois alelos: C/C, T/T ou C/T.

Figura 6 - Eletroforese em gel de poliacrilamida para detecção do SNP -2383 C/T do gene FOXP3



Legenda: PPM: padrão de peso molecular 100 pb; B: Branco poço (1); Alelo T (2); Alelo C poço (3;4); Genótipo C/T poço (5)

3.8 DOSAGENS DAS FORMAS SOLÚVEIS DE HLA-G (HLA-G1 E HLA-G5) E GAL-1

As dosagens das formas solúveis de HLA-G (HLA-G1 e HLA-G5) foram realizadas através do kit comercial EXBIO (Praha a.s., Vestec, Czech Republic) e de Gal-1 pelo kit comercial R&D Systems (Inc., Minneapolis, USA). Os dois kits empregam a utilização de ensaio imunoenzimático do tipo *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) sanduíche. Os procedimentos para dosagens seguiram as determinações dos fabricantes segundo seus respectivos manuais. Amostras de plasma com anticoagulante EDTA dos pacientes e controles foram selecionadas e agrupadas em *pool* de amostras de acordo com a genotipagem do polimorfismo do gene HLA-G e dados clínicos semelhantes (idade, sexo, tempo de infecção, carga viral, tratamento, comorbidades).

Em uma placa de 96 poços específica para testes de ELISA, foram dosados 81 pacientes sob TARV e 4 sem TARV classificados em grupos: 13 pacientes com comorbidade de genótipo Del/Del (4 *pool* de amostras com 3 pacientes em cada *pool*/poço da placa e 1 amostra de paciente sem TARV/poço); 15 pacientes sem comorbidades Del/Del (5 *pool* de amostras com 3 pacientes em cada *pool*/poço da placa); 13 pacientes com comorbidades

Ins/Ins (4 *pool* de amostras com 3 pacientes em cada *pool*/poço da placa e 1 amostra de paciente sem TARV/poço); 15 pacientes sem comorbidades Ins/Ins (5 *pool* de amostras com 3 pacientes em cada *pool*/poço da placa); 16 pacientes com comorbidades Ins/Del (5 *pool* de amostras com 3 pacientes em cada *pool*/poço da placa e 1 amostra de paciente sem TARV/poço); 13 pacientes sem comorbidades Ins/Del (4 *pool* de amostras com 3 pacientes em cada *pool*/poço da placa e 1 amostra de paciente sem TARV/poço).

Na mesma placa foram dosadas 27 amostras de controles classificados nos seguintes grupos: 9 indivíduos com genótipo Del/Del (3 *pool* de amostras com 3 controles cada/poço); 9 indivíduos com genótipo Ins/Ins (3 *pool* de amostras com 3 controles cada/poço); e 9 indivíduos com genótipo Ins/Del (3 *pool* de amostras com 3 controles cada/poço). Para cálculo dos resultados foi utilizado uma curva padrão com branco em cada kit conforme suas especificações. O esquema das amostras nas placas de ELISA pode ser visto na Figura 7.

Cada dosagem de pool de amostras, amostra única, curva padrão e branco foi feita em duplicata. A densidade óptica foi medida em 450 nm em espectrofotômetro para os dois kits. Resultados foram expressos em unidades por mililitro (U/mL) para HLA-G e nanogramas por mililitro (ng/mL) para Gal-1.

Figura 7 – Esquema das amostras nas placas de ELISA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CP	CP	POOL	POOL	POOL	POOL	POOL	POOL	POOL	POOL	POOL	POOL
B	CP	CP	POOL	POOL	POOL	POOL	POOL	POOL	POOL	POOL	POOL	POOL
C	CP	CP	POOL	POOL	POOL	POOL	POOL	POOL	POOL	POOL	POOL	POOL
D	CP	CP	POOL	POOL	POOL	POOL	POOL	POOL	POOL	POOL	POOL	POOL
E	CP	CP	SEM TARV	SEM TARV	POOL	POOL	SEM TARV	SEM TARV	POOL	POOL	POOL	POOL
F	CP	CP	POOL	POOL	POOL	POOL	POOL	POOL	SEM TARV	SEM TARV	SEM TARV	SEM TARV
G	CP	CP	POOL	POOL	POOL	POOL	POOL	POOL	POOL	POOL	POOL	POOL
H	B	B	POOL	POOL	POOL	POOL	POOL	POOL	POOL	POOL	POOL	POOL

Legenda. CP: Curva Padrão; B: Branco; Pool/Sem TARV: Pacientes com comorbidades Del/Del; Pool: Pacientes sem comorbidades Del/Del; Pool/Sem Tarv: Pacientes com comorbidades Ins/Ins; Pacientes sem comorbidades Ins/Ins; Pool/Sem Tarv: Pacientes com comorbidades Ins/Del; Pool/Sem Tarv: Pacientes sem comorbidades Ins/Del; Pool: Controles Del/Del; Pool: Controles Ins/Ins; Pool: Controles Ins/Del

3.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para a análise dos prontuários, os dados compilados no programa *Microsoft® Excel®* 2013, foram analisados para obtenção de valores absolutos, frequências e médias pelo método de contagem direta. A adesão de proporções genotípicas às expectativas de Hardy-Weinberg foram determinadas pelo teste exato de Guo e Thompson (1992), usando o software *genepop* v. 4.0.10. A frequência alélica foi calculada a partir da divisão do número de alelos encontrados pelo total de alelos analisados e a frequência genotípica foi obtida como quociente do número de genótipos encontrados pelo número de indivíduos estudados. Para análise estatística das tabelas de contensão, foi utilizado o teste exato de Fisher e *Odds Ratio*, calculados a partir do *software* a *Graphpad InStat®3* (version 3.5, USA, 2000).

Na comparação da significância estatística entre os grupos nas dosagens de HLA-G e Gal-1, foi utilizado software *GraphPad Prisma* (version 1.5 CA, USA, 2000) para realização de testes ANOVA ONE WAY e pós testes de BONFERRONI e TUKEY. Foram considerados valores de p estatisticamente diferentes aqueles cujos valores foram $<0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 PERFIL CLÍNICO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO

O grupo de pacientes deste estudo contou com a participação de 200 PVHIV acompanhadas e atendidas no CRT IST/AIDS do município de Vitória no Espírito Santo e o grupo controle com 200 doadores do HEMOES de Vitória.

O perfil clínico dos participantes foi determinado com a coleta dos seguintes dados em prontuários médicos: sexo, idade na coleta, categoria de exposição (heterossexual, bissexual, homossexual, transmissão vertical e não declarado), tempo de infecção, carga viral (indetectável e valores detectáveis), contagem de células CD4, terapia medicamentosa (sob TARV ou não) e comorbidades desenvolvidas após infecção do HIV.

A distribuição dos sexos dos doadores se deu com 57 (28,5%) do sexo feminino e 143 (71,5%) do sexo masculino e a média de idade na coleta foi de 37 anos, com mínimo de 18 anos e máximo de 67 anos.

Em relação ao grupo de pacientes, 71 (35,5%) pacientes eram do sexo feminino e 129 (64,5%) do sexo masculino. Na avaliação das idades no momento da coleta para o estudo, observou-se média de 43 anos (mínimo de 18 anos e máximo de 75 anos), tendo como tempo médio de infecção pelo vírus de 9 anos (mínimo 1 ano e máximo 28 anos). Em relação aos exames laboratoriais para controle do prognóstico da infecção, a contagem de células CD4+ apresentou média de 660 células/ μ L de sangue (mínimo de 44 células/ μ L e máximo de 1460 células/ μ L). Sobre a carga viral, dos 200 participantes, 159 (79,5%) apresentaram carga viral indetectável e 41(20,5%) apresentaram carga viral detectável no exame realizado no dia da coleta de amostras para o estudo. Dos 41 pacientes com carga viral detectável, 1 teve detecção de falha no controle da infecção e 6 deles não estavam sob TARV, porém 2 começaram a terapia após esse exame. Estas características clínicas dos grupos de pacientes e controles encontram-se reunidas na tabela 6.

Tabela 6 - Características clínicas dos grupos de pacientes e controles

Características	Pacientes (n=200)	Controles (n=200)
Sexo, feminino:masculino, No. (%)	71 (35,5):129 (64,5)	57 (28,5):143(71,5)
Idade na coleta, média (IC95%), anos	43 (41-44)	37 (35-38)
Tempo de infecção, média (IC95%), anos	9 (8-10)	-
Contagem de células CD4*, média (IC95%), células/ μ L	660 (622-699)	-
Carga Viral RNA, Indetectáveis**:Detectáveis, No. (%)	159 (79,5):41(20,5)	-
Carga Viral RNA detectáveis média (IC95%), cópias/mL	20487 (-17056-58030)	-
TARV, Sob TARV:Sem TARV, No. (%)	194 (97):6 (3)	-

IC: Intervalo de Confiança; TARV: Terapia Antirretroviral; *Valor de Referência Saudáveis: entre 500 e 1200 células/ μ L; **Resultados<50 cópias/mL

Acerca das categorias de exposição ao HIV, o grupo de maior incidência foi de pacientes com exposição heterossexual (50,5%), sendo a maioria do sexo feminino (29,5%), seguidos de relações homossexuais (27%), não declarados (17,0%), relações bissexuais (4,0%) e exposição sanguínea por transmissão vertical (1,5%) (Tabela 7). Nesses pacientes não foram registrados casos de outras categorias de exposição sanguínea como usuários de drogas injetáveis (UDI), hemofílico, transfusão sanguínea e acidente de trabalho com material biológico.

Tabela 7 - Perfil dos pacientes segundo categoria de exposição e sexo

Categoria de Exposição	n (%)	M* n (%)	F** n (%)
Heterossexual	101 (50,5)	42 (21,0)	59 (29,5)
Homossexual	54 (27,0)	54 (27,0)	0 (0,0)
Bissexual	8 (4,0)	7 (3,5)	1 (0,5)
Vertical	3 (1,5)	1 (0,5)	2 (1,0)
Não Declarado	34 (17,0)	26 (13,0)	8 (4,0)
Total	200 (100)	130 (65,0)	70 (35,0)

*M: Masculino;**F:Feminino

Seguindo para a análise das comorbidades, 83 pacientes dos 200 PVHIV desenvolveram comorbidades após diagnóstico da infecção pelo HIV. As comorbidades foram classificadas nas seguintes desordens: metabólica, neurocognitiva, ósseas, cardiovasculares, cânceres, autoimunes/inflamatórias, renal e hepática. A tabela 8 apresenta a distribuição de pacientes nessas categorias.

Tabela 8 - Número de pacientes que desenvolveram comorbidades, após diagnóstico da infecção pelo HIV, categorizados em desordens conforme perfil das doenças associadas

Desordem	Comorbidades associadas	n=83* (%)
Metabólica	Dislipidemias, diabetes <i>mellitus</i> tipo 2, anemias crônicas.	37 (44,6)
Cardiovascular	Hipertensão arterial sistêmica, insuficiência cardíaca congestiva.	29 (34,9)
Neurocognitiva	Neuropatias periféricas, depressão, ansiedade, insônia, epilepsia, distúrbios psiquiátricos.	30 (36,1)
Câncer	Pele, laringe, cervical, ovário, tireoide, reto, sarcoma de Kaposi.	11 (13,3)
Autoimune/Inflamatória	Lúpus eritematoso sistêmico, hipotireoidismo, psoríase, artrites, artroses, gota, doença de Crohn.	11 (13,3)
Óssea	Osteopenia.	5 (6,0)
Renal	Comprometimentos da função renal, doença renal crônica.	4 (4,8)
Hepática	Disfunções hepáticas.	2 (2,4)

*O mesmo paciente pode ter sido categorizado em desordens distintas

4.2 PERFIL GENÉTICO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO

4.2.1 Análise do Polimorfismo de Ins/Del de 14 pb do gene HLA-G (rs371194629)

Na avaliação de polimorfismos gênicos, todos os pacientes (n=200) e todos os indivíduos controles (n=200), foram submetidos à tipagem do polimorfismo de Ins/Del de 14 pb dentro do éxon 8 entre os sítios +2961 a +2974 na região 3' UTR do gene HLA-G.

As frequências alélicas e genotípicas não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos de pacientes e controles, conforme descrito na tabela 9. Entre o grupo de pacientes com comorbidades e controles não houve diferenças estatisticamente significantes nas frequências alélicas, porém na distribuição das frequências genotípicas desse polimorfismo observamos os seguintes resultados (Tabela 10):

- **Genótipo Ins/Ins e Ins/Del:** não ocorreram alterações estatisticamente significantes.

- **Genótipo Del/Del:** O genótipo Del/Del foi menos frequente nos pacientes com comorbidades ($p < 0,0469$; OR=0,5370; IC 95%=0,2954 a 0,9781) quando comparado aos controles.

Tabela 9 – Distribuição das frequências (%) alélica e genótípicas do polimorfismo Ins/Del de 14 pb na região 3' UTR do gene HLA-G em pacientes (n=200) e controles (n=200)

14pb Ins/Del	Pacientes, n (%)	Controles, n (%)	Teste Exato de Fisher
Alelos			
Inserção	173 (43,25)	168 (42,00)	$p=0,7749$
Deleção	227 (56,75)	232 (58,00)	$p=0,7749$
Genótipos			
Ins/Ins	36 (18,00)	36 (18,00)	$p=1,1035$
Ins/Del	101 (50,50)	96 (48,00)	$p=0,6892$
Del/Del	63 (31,50)	68 (34,00)	$p=0,5118$

n: número de alelos e genótipos; (%): frequência alélica e genotípica; p = valor de p

Tabela 10 - Distribuição das frequências (%) alélica e genótípicas do polimorfismo Ins/Del de 14 pb na região 3' UTR do gene HLA-G em pacientes com comorbidades (n=83) e controles (n=200)

14pb Ins/Del	Pacientes com comorbidades, n (%)	Controles, n (%)	Teste Exato de Fisher
Alelos			
Inserção	81 (48,80)	168 (42,00)	$p=0,1629$
Deleção	85 (51,20)	232 (58,00)	$p=0,1629$
Genótipos			
Ins/Ins	16 (19,30)	36 (18,00)	$p=0,8663$
Ins/Del	49 (59,00)	96 (48,00)	$p=0,1168$
Del/Del	18 (21,70)	68 (34,00)	$p<0,0469^*$

n: número de alelos e genótipos; (%): frequência alélica e genotípica; p = valor de p

Adicionalmente, foram realizadas análises das frequências alélicas e genótípicas entre os grupos de pacientes com comorbidade e sem comorbidades. As frequências alélicas não foram estatisticamente diferentes entre os grupos analisados, porém quando avaliado a distribuição das frequências genótípicas desse polimorfismo observamos os seguintes resultados (Tabela 11):

- **Genótipo Ins/Ins:** não ocorreram alterações estatisticamente significantes.

- **Genótipo Ins/Del:** O genótipo Ins/Del foi mais frequente nos pacientes com comorbidades ($p<0,0457$; OR=1,8010; IC 95%=1,0190 a 3,1840) quando comparado aos pacientes sem comorbidades.

- **Genótipo Del/Del:** O genótipo Del/Del foi menos frequente nos pacientes com comorbidades ($p<0,0136$; $OR=0,4431$; $IC\ 95\%=0,2333$ a $0,8415$) quando comparado aos pacientes sem comorbidades.

Tabela 11 - Distribuição das frequências (%) alélica e genotípicas do polimorfismo Ins/Del de 14 pb na região 3' UTR do gene HLA-G em pacientes com comorbidades (n=83) e pacientes sem comorbidades (n=117)

14pb Ins/Del	Pacientes com comorbidades, n (%)	Pacientes sem comorbidades, n (%)	Teste Exato de Fisher
Alelos			
Inserção	81 (48,80)	92 (39,3)	$p=0,0656$
Deleção	85 (51,20)	142 (60,7)	$p=0,0656$
Genótipos			
Ins/Ins	16 (19,30)	20 (17,1)	$p=0,7120$
Ins/Del	49 (59,00)	52 (44,4)	$p<0,0457^*$
Del/Del	18 (21,70)	45 (38,5)	$p<0,0136^*$

n: número de alelos e genótipos; (%): frequência alélica e genotípica; p = valor de p

4.2.2 Análise do SNP -2383 C/T do gene FOXP3 (rs3761549)

Na avaliação do SNP -2383 C/T da região promotora do gene FOXP3 foram submetidos à tipagem todos os pacientes (n=200) e todos os indivíduos controles (n=200). A análise estatística deste polimorfismo foi dividida entre os sexos nos grupos avaliados, pois o gene FOXP3 é expresso somente no cromossomo X. As frequências alélicas e genotípicas foram analisadas entre os grupos de pacientes e controles (Tabela 12), pacientes com comorbidades e controles (Tabela 13) e pacientes com e sem comorbidades (Tabela 14). Contudo, não apresentaram diferenças estatisticamente significantes.

Tabela 12 - Distribuição das frequências alélica e genotípicas do SNP -2383 na região promotora do gene FOXP3 em pacientes do sexo feminino (n=71) e masculino (n=129) e controles do sexo feminino (n=56) e masculino (n=144)

(continua)

Sexo Feminino		Pacientes, n (%)	Controles, n (%)	Teste Exato de Fisher
Genótipo	CC	67 (94,4)	52 (92,9)	$p=0.7307$
	CT	1 (1,4)	4 (7,1)	$p=0.1688$
	TT	3 (4,2)	0.0	$p=0.2546$
Alelo	C	135 (95,1)	108 (96,4)	$p=0.7596$

Tabela 13 - Distribuição das frequências alélica e genótípicas do SNP -2383 na região promotora do gene FOXP3 em pacientes do sexo feminino (n=71) e masculino (n=129) e controles do sexo feminino (n=56) e masculino (n=144)

(continuação)

	T	7 (4,9)	4 (3,6)	$p=0.7596$
Sexo Masculino		Pacientes, n (%)	Controles, n (%)	Teste Exato de Fisher
Genótipo e Alelo	C	120 (93,0)	130 (90,3)	$p=0.5144$
	T	9 (7,0)	14 (9,7)	$p=0.5144$
Ambos os Sexos		Pacientes, n (%)	Controles, n (%)	Teste Exato de Fisher
Frequência Genotípica	C ou CC	187 (93,5)	182 (91,0)	$p=0.4550$
	CT	1 (0,5)	4 (2,0)	$p=0.3719$
Total	T ou TT	12 (6,0)	14 (7,0)	$p=0.8397$
Frequência	C	255 (94,1)	238 (93,0)	$p=0.7233$
Alélica Total	T	16 (5,9)	18 (7,0)	$p=0.7233$

n: número absoluto de alelos e genótipos; p = valor de p

(conclusão)

Tabela 14 - Distribuição das frequências alélica e genótípicas do SNP -2383 na região promotora do gene FOXP3 em pacientes com comorbidades do sexo feminino (n=33) e masculino (n=50) e controles do sexo feminino (n=56) e masculino (n=144)

(continua)

Sexo Feminino		Pacientes com comorbidades, n (%)	Controles, n (%)	Teste Exato de Fisher
Genótipo	CC	31 (94,0)	52 (92,9)	$p=1,0000$
	CT	1 (3,0)	4 (7,1)	$p=0,6474$
	TT	1 (3,0)	0,0	$p=0,3708$
Alelo	C	63 (95,5)	108 (96,4)	$p=0,7113$
	T	3 (4,5)	4 (3,6)	$p=0,7113$
Sexo Masculino		Pacientes com comorbidades, n (%)	Controles, n (%)	Teste Exato de Fisher
Genótipo e Alelo	C	46 (92,0)	130 (90,3)	$p=1,0000$
	T	4 (8,0)	14 (9,7)	$p=1,0000$
Ambos os Sexos		Pacientes com comorbidades, n (%)	Controles, n (%)	Teste Exato de Fisher
Frequência Genotípica	C ou CC	77 (92,8)	182 (91,0)	$p=0,8153$
	CT	1 (1,2)	4 (2,0)	$p=1,0000$
Total	T ou TT	5 (6,0)	14 (7,0)	$p=1,0000$

Tabela 13 - Distribuição das frequências alélica e genóticas do SNP -2383 na região promotora do gene FOXP3 em pacientes com comorbidades do sexo feminino (n=33) e masculino (n=50) e controles do sexo feminino (n=56) e masculino (n=144)

(continuação)

Ambos os Sexos		Pacientes com comorbidades, n (%)	Controles, n (%)	Teste Exato de Fisher
Frequência	C	109 (94,0)	238 (93,0)	$p=0,8257$
Alélica Total	T	7 (6,0)	18 (7,0)	$p=0,8257$

n: número absoluto de alelos e genótipos; p = valor de p

(conclusão)

Tabela 14 - Distribuição das frequências alélica e genóticas do SNP -2383 na região promotora do gene FOXP3 em pacientes com comorbidades do sexo feminino (n=33) e masculino (n=50) e pacientes sem comorbidades do sexo feminino (n=38) e masculino (n=79)

Sexo Feminino		Pacientes com comorbidades, n (%)	Pacientes sem comorbidades, n (%)	Teste Exato de Fisher
Genótipo	CC	31 (94,0)	36 (94,7)	$p=1.0000$
	CT	1 (3,0)	0.0	$p=0.4648$
	TT	1 (3,0)	2 (5,3)	$p=1.0000$
Alelo	C	63 (95,5)	72 (94,7)	$p=1.0000$
	T	3 (4,5)	4 (5,3)	$p=1.0000$
Sexo Masculino		Pacientes com comorbidades, n (%)	Pacientes sem comorbidades, n (%)	Teste Exato de Fisher
Genótipo e Alelo	C	46 (92,0)	74 (93,7)	$p=0.7341$
	T	4 (8,0)	5 (6,3)	$p=0.7341$
Ambos os Sexos		Pacientes com comorbidades, n (%)	Pacientes sem comorbidades, n (%)	Teste Exato de Fisher
Frequência Genotípica Total	C ou CC	77 (92,8)	110 (94,0)	$p=0.7758$
	CT	1 (1,2)	0.0	$p=0.4150$
	T ou TT	5 (6,0)	7 (6,0)	$p=1.0000$
Frequência	C	109 (94,0)	146 (94,0)	$p=1.0000$
Alélica Total	T	7 (6,0)	9 (5,8)	$p=1.0000$

n: número absoluto de alelos e genótipos; p = valor de p

4.3 DOSAGENS DAS FORMAS SOLÚVEIS DE HLA-G E GAL-1

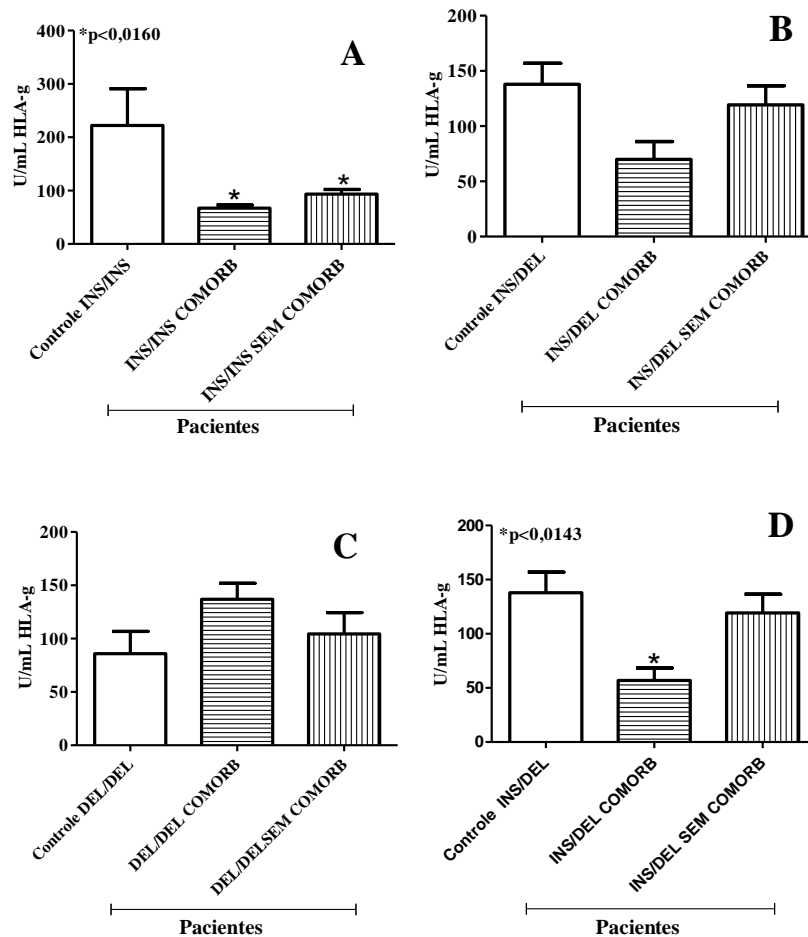
4.3.1- Níveis plasmáticos de HLA-G (HLA-G1 E HLA-G5)

O HLA-G solúvel foi quantificado utilizando o método ELISA (Figura 7). Os grupos de pacientes com e sem comorbidades de genótipo Ins/Ins apresentaram níveis menores estatisticamente significantes em relação aos controles Ins/Ins ($p<0,0160$) (Figura 8A). Adicionalmente, foram realizadas análises comparativas entre os grupos de pacientes com comorbidades, sem comorbidades e controles de genótipo Ins/Del (Figura 8B), e os grupos de pacientes com comorbidades, sem comorbidades e controles de genótipo Del/Del (Figura 8C), entretanto não foram encontradas alterações estatisticamente significantes entre todos os grupos avaliados. Contudo, ao comparar controles, pacientes com e sem comorbidades Ins/Del, excluindo as dosagens dos pacientes sem TARV da análise, pacientes com comorbidades apresentaram níveis menores de HLA-G solúvel em relação aos controles e aos pacientes sem comorbidades ($p<0,0143$) (Figura 8D).

4.3.2 - Níveis plasmáticos de Gal-1

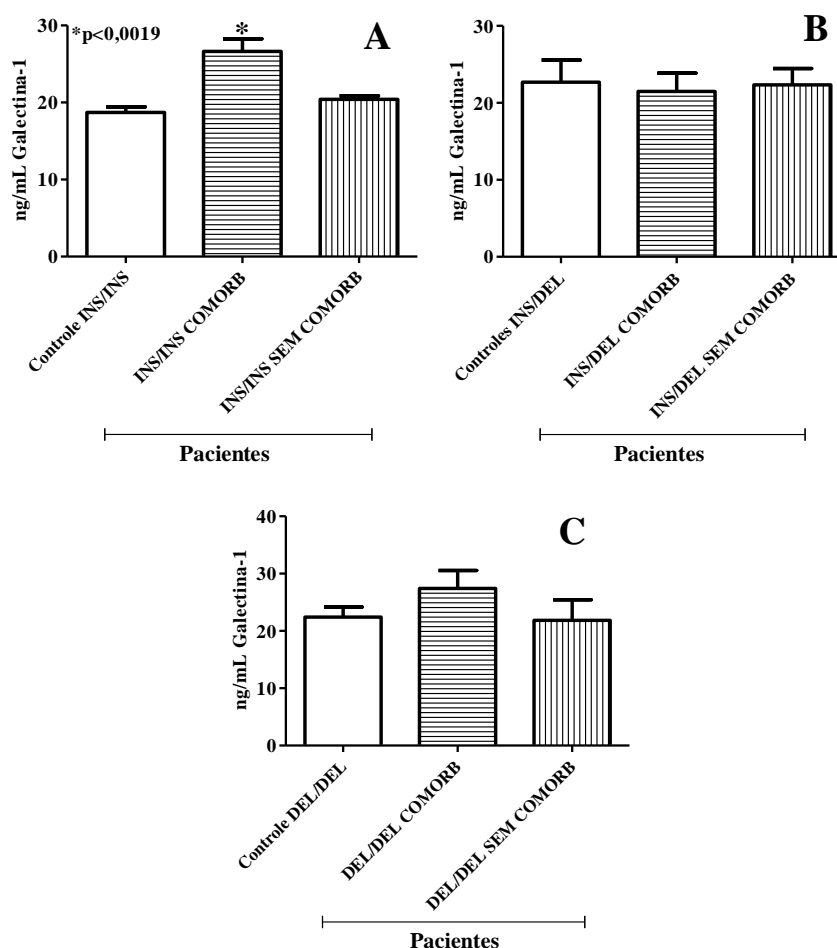
A Gal-1 solúvel foi quantificada utilizando o método ELISA (Figura 7). O grupo de pacientes com comorbidades de genótipo Ins/Ins apresentou níveis maiores estatisticamente significantes em relação aos grupos de pacientes sem comorbidades Ins/Ins e controles Ins/Ins ($p<0,0019$) (Figura 9A). Adicionalmente, foram realizadas análises comparativas entre os grupos de pacientes com comorbidades, sem comorbidades e controles de genótipo Ins/Del (Figura 9B), e entre os grupos de pacientes com comorbidades, sem comorbidades e controles de genótipo Del/Del (Figura 9C). Entretanto não foram encontradas alterações estatisticamente significantes.

Figura 8 - Quantificação de HLA-G solúvel por ELISA em pacientes e controles separados por genótipos. Genótipo Ins/Ins (A); Genótipo Ins/Del (B); Genótipo Del/Del (C); Genótipo Ins/Del excluindo pacientes sem TARV (D)



Legenda. Grupos: Controle Ins/Ins (n=9), Pacientes com comorbidades Ins/Ins (n=13) e Pacientes sem comorbidades Ins/Ins (n=15) (A). Controle Ins/Del (n=9), Pacientes com comorbidades Ins/Del (n=16) e Pacientes sem comorbidades Ins/Del (n=13) (B). Controle Del/Del (n=9), Pacientes com comorbidades Del/Del (n=13) e Pacientes sem comorbidades Del/Del (n=15) (C). Controle Ins/Del (n=9), Pacientes com comorbidades Ins/Del, excluindo o sem TARV (n=15) e Pacientes sem comorbidades Ins/Del, excluindo o sem TARV (n=12) (D).

Figura 9 - Quantificação de Gal-1 solúvel por ELISA em pacientes e controles classificados por genótipos. Genótipo Ins/Ins (A); Genótipo Ins/Del (B) e Genótipo Del/Del (C).



Legenda. Grupos: Controle Ins/Ins (n=9), Pacientes com comorbidades Ins/Ins (n=13) e Pacientes sem comorbidades Ins/Ins (n=15) (A). Controle Ins/Del (n=9), Pacientes com comorbidades Ins/Del (n=16) e Pacientes sem comorbidades Ins/Del (n=13) (B). Controle Del/Del (n=9), Pacientes com comorbidades Del/Del (n=13) e Pacientes sem comorbidades Del/Del (n=15) (C).

4.4 - CORRELAÇÕES DE CARGA VIRAL COM NÍVEIS PLASMÁTICOS DE HLA-G E GAL-1 SOLÚVEIS

Após obtenção de dados clínicos importantes, como carga viral e genótipo para o polimorfismo de Ins/Del de 14 pb do gene HLA-G, foram efetuados testes de correlação entre os níveis de carga viral dos pacientes com comorbidades Ins/Ins e níveis plasmáticos de HLA-G. Conforme representado na figura 10A, não foi observado resultado estatisticamente

significante. Entretanto, ao retirar da análise a carga viral e dosagem plasmática do paciente sem TARV, obteve-se correlação positiva significativa ($r=0,9996$; $p=0,0173$) (Figura 10B). Na correlação entre os níveis de carga viral dos pacientes com comorbidades Ins/Ins e níveis plasmáticos de Gal-1, não foram observados diferenças, mesmo com a retirada da análise os dados referentes ao paciente sem TARV (Figuras 11A e 11B).

Figura 10 - Correlação entre os níveis de carga viral e níveis plasmáticos de HLA-G solúvel de pacientes com comorbidades Ins/Ins para o gene HLA-G (n=13) (A) e pacientes com comorbidades Ins/Ins, excluindo o sem TARV (n=12) (B)

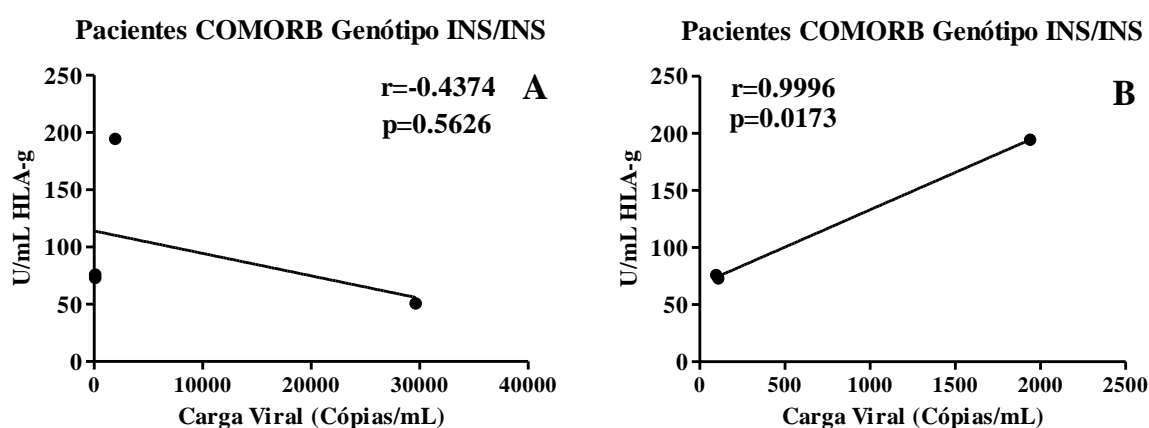
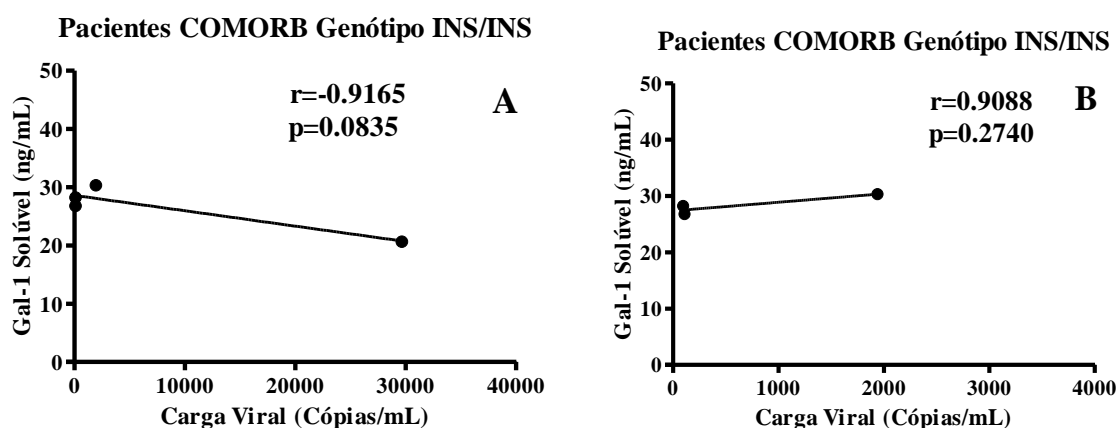


Figura 11 - Correlação entre os níveis de carga viral e níveis plasmáticos de Gal-1 solúvel de pacientes com comorbidades Ins/Ins (n=13) para o gene HLA-G (A) e pacientes com comorbidades Ins/Ins, excluindo o sem TARV (n=12) (B)



5. DISCUSSÃO

O referido estudo fez análises de perfis clínico, genéticos - polimorfismo da região 3' não traduzida do HLA-G (presença ou ausência de 14 pares de base) e SNP -2383 C/T da região promotora do fator de transcrição FOXP3 - e quantificou níveis plasmáticos das moléculas imunorregulatórias HLA-G e Gal-1 dos grupos de pacientes e controles. O perfil clínico foi traçado a fim de caracterizar os grupos com análise descritiva de sexo, idade na coleta - para os dois grupos - e categoria de exposição, tempo de infecção, contagem de células CD4+, níveis de carga viral, se estava sob TARV ou não e desenvolvimento de comorbidades após diagnóstico para o grupo de pacientes.

No grupo de pacientes, das 200 PVHIV, 129 (64,5%) são do sexo masculino e 71 (35,5%) do sexo feminino. Estes dados são representativos de PVHIV do local de estudo por irem ao encontro dos indicadores e dados básicos da AIDS do município de Vitória, onde por meio do recorte populacional entre sexos, observa-se a incidência de casos maior na população masculina quando comparado à feminina (BRASIL, 2017b), seguindo também a tendência nacional, no qual foram registrados, de 1980 até junho de 2017, 65,5% dos casos na população masculina e 34,7% na feminina (BRASIL, 2017c).

O grupo de pacientes também é representativo em relação à categoria de exposição ao vírus. Verificou-se que pacientes com exposição heterossexual foi a mais frequente (50,5%), com maioria do sexo feminino (29,5%), seguidos de exposição homossexual (27%), heterossexual masculina (21%), não declarada (17,0%), bissexual (4,0%) e exposição sanguínea por transmissão vertical (1,5%). No Brasil, dos casos notificados de 1980 até junho de 2017, a maior incidência também foi de exposição heterossexual (51,9%), com maioria da população feminina (28,9%), seguidos da população masculina com exposição heterossexual (23,0%), homossexual (15,4%), não declarada (14,4%), exposição sanguínea (11,5% dos quais 0,3% por transmissão vertical) e bissexual (6,8%) (BRASIL, 2017c). A frequência de exposição ao HIV foi maior em homossexuais do que heterossexuais (masculinos), nos participantes do estudo. Este fato pode ser justificado pelos pacientes residirem no município Vitória do estado Espírito Santo, cuja maioria das PVHIV está na categoria de exposição homossexual (29,4%) (BRASIL, 2017b), além disso, Vitória faz parte da região Sudeste do

país, única região com maior frequência de PVHIV nessa categoria (27,7%) (BRASIL, 2017c).

O predomínio da categoria de exposição homossexual (homens) em regiões e cidades específicas, como região Sudeste e o município Vitória, tem contribuído para o registro do aumento da proporção de casos em homossexuais e bissexuais no país nos últimos dez anos, a qual passou de 35,6% em 2006 para 47,3% em 2016 (BRASIL, 2017c). Por se tratar de uma categoria que abrange diferentes experiências subjetivas individuais e de vulnerabilidade, é necessário que sejam levadas em consideração recortes sociais como, por exemplo, tipo de parceria, cor da pele, idade e condição socioeconômica, a fim de que as políticas públicas de prevenção e cuidado sejam mais efetivas e atendam as especificidades dessa população (REDOSCHI et al., 2017).

Vale destacar também que apesar da população feminina ter menor prevalência de infecção pelo HIV no país, suas particularidades demandam atenção e políticas específicas (BRASIL, 2017c; UNAIDS, 2018). Por questões culturais e sociais, como a desigualdade de gênero e os baixos níveis de escolaridade, as mulheres têm sido prejudicadas no conhecimento sobre sua vida sexual e na negociação com o parceiro sobre o uso de preservativos de forma adequada, tornando-as mais vulneráveis a práticas de relações sexuais sem a devida proteção (ACOSTA; GONÇALVES; BARCELLOS, 2016). Outros fatores como o diagnóstico e assistência tardia, quando do adoecimento do parceiro ou do filho infectado verticalmente, têm promovido redução na sobrevida bem como na qualidade de vida, mesmo diante dos diferentes avanços com a TARV, além de recorrentes problemas de acesso nos serviços competentes para o atendimento da população feminina (serviços de ginecologia e obstetrícia) e nos serviços especializados para PVHIV (CARVALHO; BARROSO; GALVÃO, 2006; CARVALHO et al., 2008).

Os dados de contagem de células CD4⁺ e carga viral, referentes ao controle de prognóstico do HIV e tratamento nos pacientes deste estudo, representam os esforços e progressos da região para controle da epidemia no país. Em relação à contagem de células CD4⁺, a média de 660 células/ μ L, dentro dos valores de referência saudáveis, indicam bom prognóstico na recuperação da resposta imunológica com o tratamento adequado nos pacientes do estudo (BRASIL, 2018).

A Organização das Nações Unidas (ONU), por meio do Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS (UNAIDS), estabeleceu em 2013 o programa da Meta Global 90-90-90, que visa por fim à epidemia de AIDS no mundo até 2030 (UNAIDS BRASIL, 2015). A meta global a ser alcançada pelos países e regiões que se uniram a esses esforços, a partir de 2015, consiste em que até 2020, 90% de todas as PVHIV sejam diagnosticadas; sendo que 90% das pessoas diagnosticadas recebam TARV ininterruptamente; e que 90% de todas as pessoas recebendo TARV tenham supressão viral (carga viral indetectável) (UNAIDS BRASIL, 2015). Neste estudo, 97% (196 pacientes) das PVHIV estavam sob TARV sendo que dessas, 81,9% (159 pacientes) estavam com carga viral indetectável. No Brasil, levando em consideração os dados de 2016, a estimativa é que das 830 mil PVHIV, 84% foram diagnosticadas e destas 72% estão em tratamento. Dentre estas últimas, 91% apresentavam carga viral indetectável (BRASIL, 2017d). Em relação à idade e tempo de infecção, as PVHIV participantes deste estudo, apresentaram média de 43 anos de idade no momento da coleta com tempo médio de infecção de 9 anos, variando de 1 ano à 28 anos da data em que foi diagnosticada a doença.

Este estudo avaliou o impacto do SNP -2383 C/T do gene FOXP3 no desenvolvimento de comorbidades dos grupos pacientes e controles. O FOXP3 é um importante marcador de células Tregs que por sua vez desempenham funções benéficas ou prejudiciais para o hospedeiro no curso da infecção pelo HIV ao regular o sistema imune, seus processos inflamatórios e a expansão do vírus no organismo (IMAMICHI; LANE, 2012; KLEINMAN et al., 2018). Existem evidências que a progressão clínica da infecção pelo HIV está associada com as consequências negativas da ativação imune progressiva causada pelos níveis plasmáticos de HIV-1 (LAWN; BUTERA; FOLKS, 2001). Os níveis aumentados e persistentes de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1, IL-6, elevação da proteína C reativa e do dímero D mesmo sob TARV na fase crônica da infecção, reforçam a relevância da ativação imune no prognóstico da infecção. (BAKER et al., 2011).

As funções das células Treg na infecção pelo HIV-1 ainda não estão totalmente elucidadas. Contudo, nesse contexto de inflamação progressiva e exacerbada, que contribuem no desenvolvimento de comorbidades, as células Treg desempenham funções benéficas para o hospedeiro ao diminuírem a ativação imune excessiva (IMAMICHI; LANE, 2012). Adicionalmente, as células Treg transformam o estado ativado das células TCD4+ infectadas para estado de repouso, suprimindo a produção viral e o avanço da doença (KLEINMAN et

al., 2018). Por outro lado, a atuação de células Treg pode ser prejudicial, uma vez que o estado de repouso das células TCD4+ infectadas contribui para a formação de reservatórios virais, além de que as próprias células Treg podem ser alvo para infecção do vírus, constituindo novos reservatórios ao terem suas funções efetivas comprometidas pelo vírus em seu interior (ANGIN et al., 2014; MORENO-FERNANDEZ et al., 2009; PION et al., 2013; TRAN et al., 2008). De forma complementar, dentre as funções supressoras da resposta imune, as células TCD8+ que desempenham funções específicas contra o vírus também são suprimidas, o que favorece o escape viral (KINTER et al., 2007). As células Treg podem também diminuir as respostas inespecíficas impedindo a depleção das células T CD4+ e outras respostas inflamatórias (SIQUEIRA-BATISTA et al. 2012). Se por um lado depleção de células Treg pode auxiliar no combate ao vírus e à formação de reservatórios virais, por outro pode desencadear processos inflamatórios igualmente prejudiciais para o hospedeiro (KLEINMAN et al., 2018).

O gene regulador FOXP3 (o qual codifica um fator de transcrição também denominado FOXP3), induz a supressão das células T efectoras, bloqueando a ativação e a função destes linfócitos, sendo assim importantes no controle da resposta imunológica a antígenos próprios e não-próprios. Diante disto, observou-se a relação do fator de transcrição FOXP3 na regulação do desenvolvimento e na função das células Treg, e a correlação da perda de expressão deste fator com diminuição da capacidade supressora das Tregs. A expressão de FOXP3 pode ser induzida por células T efectoras que não possuem atividade supressora, por meio da ativação simultânea de múltiplos fatores de transcrição. Essa ativação ocorre através de receptores de células T (TCR) e receptores de citocinas incluindo o receptor TGF- β (TONE; GREENE, 2011).

Os polimorfismos que afetam a produção de FOXP3, consequentemente são relacionados com aumento ou diminuição de Tregs no organismo, sendo associados com diversas doenças humanas multifatoriais como doenças autoimunes e cânceres (ODA et al., 2013). Contudo, neste estudo não foram encontrados resultados estatisticamente significantes entre os grupos de pacientes e controles para o SNP -2383 C/T do gene FOXP3 que indicassem alterações significativas na produção desse fator de transcrição e no desenvolvimento de comorbidades. Levando em consideração as informações obtidas na literatura, estudos que abordaram a análise do SNP -2383 C/T do gene FOXP3 avaliaram apenas pacientes com cânceres e doenças autoimunes associando com susceptibilidade e/ou

risco de progressão para a doença analisada (ANDRÉ et al., 2011; BARBOSA et al., 2012; BOSSOWSKI et al., 2014; IN et al., 2017; INOUE et al., 2010; JIANG; RUAN, 2014; LAN et al., 2010; NAM et al., 2018; SHEHJAR et al., 2018; YAO et al., 2018)

Concomitantemente às análises do polimorfismo gênico do FOXP3, o presente estudo avaliou o impacto da produção da molécula de HLA-G, pelo polimorfismo de Ins/Del de 14 pb da região 3'UTR do gene HLA-G, nos grupos pacientes, controles e a relação com o desenvolvimento de comorbidades. Das 200 PVHIV participantes do estudo, 83 apresentaram alguma desordem associada à comorbidades. Nas análises entre os grupos, o primeiro resultado estatisticamente significativo foi a observação da menor frequência do genótipo Del/Del nos pacientes com comorbidades quando comparado aos controles. Pelo fato do genótipo Del/Del estar associado com perfil alto produtor da molécula HLA-G, este resultado sugere proteção para o desenvolvimento de comorbidades não infecciosas nos controles, uma vez que o HLA-G possui ação anti-inflamatória que pode minimizar as chances de desenvolvimento de comorbidades relacionadas com estado inflamatório persistente.

Em seguida, observou-se que o genótipo Ins/Del esteve mais frequente nos pacientes com comorbidades quando comparado aos pacientes sem comorbidades, sendo esta diferença estatisticamente significativa, indicando que o alelo Ins mesmo em genótipo heterozigoto influencia para o desenvolvimento de comorbidades em PVHIV pela possibilidade de diminuir a produção do HLA-G tornando-as mais vulneráveis aos quadros inflamatórios crônicos e suas consequências. É importante ressaltar que mesmo não tendo resultado estatístico significativo, a maior frequência do alelo Ins foi em pacientes com comorbidades (48,80%) quando comparado aos sem comorbidades (39,30%). Dessa forma, constatou-se uma tendência ao perfil facilitador do alelo Ins no genótipo Ins/Del no desenvolvimento de comorbidades em PVHIV. Por sua vez, os pacientes sem comorbidades apresentaram maior frequência significativa do genótipo Del/Del quando comparados aos pacientes com comorbidades.

Os indivíduos que possuem o genótipo Del/Del produzem mais HLA-G. Dessa forma, essa molécula pode regular e diminuir a inflamação persistente típica de PVHIV, evitando o desenvolvimento de outras comorbidades associadas ao estado inflamatório crônico. Por outro lado, esse genótipo alto produtor de HLA-G pode favorecer o escape viral contribuindo para a expansão da infecção. Entretanto, por se tratar de população majoritariamente sob TARV

(97%) neste estudo, o controle da replicação viral pode não ser influenciado apenas pela alta produção de HLA-G, uma vez que outros mecanismos supressores virais provenientes da TARV estão sendo utilizados concomitantemente, podendo regular e controlar o escape viral facilitado pela alta produção de HLA-G.

O impacto do polimorfismo de Ins/Del de 14 pb na região 3' UTR vem sendo amplamente estudado em diversas situações clínicas, como por exemplo: doenças autoimunes (ALBUQUERQUE et al., 2016; GERASIMOU et al., 2016; HASHEMI et al., 2016; KIM et al., 2015), rejeição de implantes embrionários (ENGHELABIFAR et al., 2014), tumores (ESKANDARI-NASAB et al., 2013; GE et al., 2014; HAGHI et al., 2015; JEONG et al., 2014; JIANG et al., 2011; LIN; YAN, 2015; TEXEIRA et al., 2013), abortos recorrentes (AL OMAR et al., 2015; WANG; JIANG; ZHANG, 2013), pré-eclampsia (PABALAN et al., 2015), infecção bacteriana por *Helicobacter pylori* (GENRE et al., 2016), infecção parasitária pela tripanossomíase humana africana (COURTIN et al., 2013) e outras infecções virais como, por exemplo, vírus da imunodeficiência humana (HIV) (HONG et al., 2015)

De acordo com informações descritas na literatura, o genótipo Del/Del promove maior produção da molécula de HLA-G solúvel (CHEN et al., 2008; MARTELLI-PALOMINO et al., 2013; RIZZO et al., 2012), favorecendo a regulação da resposta imune e no caso de infecções virais promovendo o escape viral, o que pode piorar o prognóstico de doenças (LAARIBI et al., 2015; DONADI et al., 2011).

Em relação à infecção para o HIV-1, um estudo que avaliou todo o gene HLA-G, associou alguns haplótipos com aumento no risco de transmissão vertical materno fetal (HONG et al., 2015). Neste contexto, Fabris e colaboradores (2009) relacionaram o genótipo Del/Del com efeito protetor na transmissão perinatal do HIV-1 no Brasil. Entretanto, outro estudo realizado por Segat e colaboradores (2014) associou o efeito protetor com o genótipo inserção (Ins/Ins ou Ins/Del) na transmissão intrauterina e durante o parto em crianças do Zâmbia.

Larson e colaboradores (2013) avaliaram o impacto desse polimorfismo na progressão da infecção pelo HIV-1 e sobrevivência em indivíduos não tratados com TARV. O genótipo Del/Del foi associado com elevados níveis de carga viral, baixas contagem de linfócitos T CD4+ e aumento da mortalidade, quando comparados com genótipo de inserção dos 14 pb

(LARSON et al., 2013). É importante ressaltar que ainda não existem estudos que avaliem as variações genóticas desse polimorfismo relacionando com desenvolvimento de comorbidades em PVHIV.

Adicionalmente, a análise do polimorfismo de Ins/Del de 14 pb da região 3'UTR do gene HLA-G, foram realizadas as dosagens da forma solúvel do HLA-G em PVHIV nos grupos de pacientes e controles, separando estes por genótipos Ins/Ins, Ins/Del e Del/Del. Para o genótipo Ins/Ins, os grupos de pacientes com e sem comorbidades apresentaram níveis reduzidos significativos de HLA-G solúvel quando comparados com o grupo controle. Na análise do genótipo Ins/Del, não houve resultados significativos entre os grupos analisados. Entretanto, ao realizar a mesma análise para este genótipo Ins/Del, excluindo as dosagens dos pacientes sem TARV, os pacientes com comorbidades Ins/Del apresentaram níveis reduzidos da molécula HLA-G solúvel em relação aos pacientes sem comorbidades e controles. Por fim, na análise do genótipo Del/Del, não foram observados alterações estatisticamente significantes entre os grupos.

De acordo com as informações obtidas na literatura, os níveis de HLA-G solúvel podem se apresentar elevados ou reduzidos em PVHIV. Em relação aos níveis elevados de HLA-G solúvel na infecção por HIV, Donaghy e colaboradores (2006), observaram níveis elevados de HLA-G em pacientes HIV, comparados com pacientes co-infectados por HIV e Leishmaniose Visceral, pacientes com Leishmaniose Visceral e controles. Lajoie e colaboradores (2009) observaram níveis elevados de HLA-G solúveis em pacientes HIV antes de receberem a TARV, todavia estes níveis foram reduzidos após o tratamento. Do mesmo modo, Murdaca e colaboradores (2009) observaram níveis elevados de HLA-G solúveis em pacientes HIV antes de receberem TARV, reduzindo esses níveis de HLA-G solúveis após a adesão a terapia, assim como a carga viral, ao mesmo tempo em que houve aumento da contagem de células T CD4+ e queda na contagem de células T CD8+. Este mesmo grupo posteriormente observou níveis mais elevados de HLA-G em PVHIV com doenças infecciosas oportunistas e neoplasia, sugerindo que essas condições podem acentuar a produção dessa molécula solúvel tornando-a um possível marcador para monitorar resposta virológica e reconstituição imune em PVHIV (MURDACA et al., 2011). Infecções progressivas pelo HIV em paciente sem TARV foram associadas com elevados níveis de HLA-G solúvel circulantes secretados em parte por monócitos e células dendríticas para regulação autócrina de suas funções (HUANG et al., 2010).

Considerando os resultados encontrados nas dosagens de HLA-G solúvel, os pacientes sem comorbidades com genótipos de Ins/Ins e Ins/Del, podem estar com níveis de HLA-G solúveis reduzidos devido a esta molécula já ter efetuado sua ação imunorregulatória e possivelmente estar protegendo estes pacientes contra o desenvolvimento de comorbidades em relação à infecção pelo HIV. No grupo de pacientes sem comorbidades com genótipo Del/Del, os níveis de HLA-G solúvel são semelhantes aos controles, sendo assim, a molécula pode estar desenvolvendo sua ação regulatória e protegendo essas PVHIV frente ao desenvolvimento de comorbidades.

O aumento ou a redução da expressão de HLA-G pode estar relacionada com a afinidade de miRNAs pela região polimórfica de Ins/Del de 14 pb entre a posição +2961 e +2974 na região 3' UTR do HLA-G. De acordo com dados obtidos na literatura, através de estudo *in silico*, que a consequência final da ação do miRNA sobre a produção do RNAm de HLA-G pela presença/inserção alélica de 14pb seria mais rigorosa do que a produção de RNAm pela ausência/deleção de 14pb, o que poderia explicar a diminuição da produção de HLA-G na inserção de 14pb (CASTELLI et al., 2009). Esta informação ajuda a explicar que neste estudo os pacientes com genótipos Ins/Ins apresentaram níveis de HLA-G solúvel menores que os outros grupos testados, dessa forma a baixa produção de HLA-G pode estar ligada ao favorecimento no desenvolvimento de comorbidades decorrentes da infecção por HIV. Entretanto nos pacientes HIV com comorbidades com genótipo Ins/Del e Del/Del os dados obtidos sugerem que provavelmente a produção de HLA-G não foi suficiente para impedir o desenvolvimento de comorbidades.

De forma adicional, foram feitas correlações do grupo de pacientes com comorbidades de genótipo Ins/Ins entre os níveis de carga viral e HLA-G plasmáticos. Na primeira correlação considerando os dados de todos os pacientes com comorbidades de genótipo Ins/Ins, foi observado que à medida em que os níveis de HLA-G solúvel diminuem, os níveis de carga viral aumentam. Estratificando a análise, retirando dosagens referentes ao paciente sem TARV desse grupo, foram observadas correlações positivas entre níveis de carga viral e HLA-G solúvel, ou seja, os níveis de HLA-G solúvel e carga viral aumentam de forma concomitante de forma estatisticamente significativa. Esses resultados encontram-se de acordo com o esperado pela atual literatura uma vez que a progressão da infecção pelo HIV com aumento de carga viral foi correlacionada com maiores níveis de IL-10, interleucina essa

que favorece a regulação positiva para a produção de HLA-G (MOREAU et al., 1999). Entretanto, os níveis de HLA-G plasmáticos nos pacientes com comorbidades Ins/Ins são menores quando comparados aos controles.

Além da análise da molécula imunorregulatória HLA-G, nosso estudo também avaliou a expressão solúvel da Gal-1, molécula esta que também desenvolve funções importantes no sistema imunológico. As dosagens de Gal-1 solúvel foram realizadas a fim de analisar a produção e o possível impacto dessa molécula imunorregulatória na progressão da infecção pelo HIV e no desenvolvimento de comorbidades entre os grupos de pacientes e controles. Tais grupos foram divididos de acordo com o genótipo do polimorfismo de Ins/Del 14 pb do gene HLA-G como forma de também avaliar as possíveis relações entre a produção de HLA-G solúvel e Gal-1 no contexto da infecção pelo HIV. Em relação ao genótipo Ins/Ins do gene HLA-G, pacientes com comorbidades apresentaram níveis maiores significativos de Gal-1 solúvel quando comparados com os pacientes sem comorbidades e controles. Para os demais genótipos, Ins/Del e Del/Del não foram observados resultados estatisticamente significantes. Estes resultados sugerem relação inversa entre os níveis de HLA-G solúvel e Gal-1, apontando para um possível acionamento de resposta imunológica imunorregulatória promovida pela Gal-1 mediante os baixos níveis de HLA-G solúveis.

A molécula Gal-1 pode estar significativamente aumentada ou diminuída em condições inflamatórias (ARTHUR et al., 2015). Na infecção pelo HIV-1, ela tem sido relacionada com aumento da capacidade infecciosa do vírus ao acelerar o processo de ligação e adesão do mesmo às células-alvo (ST-PIERRE et al., 2011). Foi demonstrado que a Gal-1 se liga ao vírus reconhecendo N-glicanas na gp120 do envelope viral e estudos sugerem a ligação preferencial da Gal-1 ao receptor alvo CD4 da gp120 viral (ST-PIERRE et al., 2011). Juntos, esses resultados sugerem que o HIV-1 explora Gal-1 para aumentar a interação gp120-CD4 acelerando a cinética de ligação do HIV-1 à superfície da célula-alvo de forma a aumentar a infectividade do vírus (ST-PIERRE et al., 2011).

As correlações estatísticas também foram realizadas no grupo de pacientes com comorbidades de genótipo Ins/Ins entre os níveis de carga viral e Gal-1 plasmáticas. Na primeira correlação considerando os dados de todos os pacientes com comorbidades de genótipo Ins/Ins, foi observado que na medida em que os níveis de Gal-1 solúvel diminuem, os níveis de carga viral aumentam. Estratificando a análise, retirando as dosagens referentes

ao paciente sem TARV desse grupo, foram observadas correlações positivas entre níveis de carga viral e Gal-1 solúveis, ou seja, as duas variáveis testadas aumentam de forma concomitante. O perfil de expressão das duas moléculas analisadas HLA-G e Gal-1 foram bem semelhantes. Em relação à Gal-1, a correlação positiva, corrobora com a ação da Gal-1 no favorecimento da infectividade do vírus nas células do sistema imunológico (ST-PIERRE et al., 2011).

Em relação ao paciente sem TARV, este possui genótipo Ins/Ins, apresentou comorbidade, os níveis de HLA-G e Gal-1 foram reduzidos comparados aos demais pacientes testados com este mesmo genótipo. Os níveis de carga viral também se apresentaram diminuídos e o fato deste paciente não utilizar TARV para controle da infecção o tornam parte de um grupo de pessoas com prováveis mutações genéticas que favorecem o sistema imunológico controlar a infecção viral.

Os precisos mecanismos da ativação imune crônica persistente, que contribuem para o surgimento de comorbidades, são poucos entendidos e o impacto do envelhecimento de PVHIV tratados ainda não foi esclarecido (NASI et al., 2016). Desse modo, investigações dos mecanismos imunorregulatórios na infecção pelo HIV-1 podem ser importantes no estabelecimento de novos biomarcadores para diagnóstico e prognóstico, no encontro de novos alvos terapêuticos, na prevenção da transmissão, no desenvolvimento de imunoterapias e desfechos para cura da infecção (KLEIMAN et al., 2018; ST-PIERRE et al., 2011; VASIREDDI, 2017).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O grupo de PVHIV é maioria do sexo masculino; exposto a infecção por relações heterossexuais; com bom controle do prognóstico da infecção viral por estarem majoritariamente sob TARV e com carga viral indetectável, além de apresentar média dentro dos parâmetros saudáveis de células TCD4+;
- Na análise do polimorfismo de Ins/Del de 14 pb na região 3' UTR do gene HLA-G, os genótipos Del/Del e Ins/Del foram associados com proteção contra o desenvolvimento de comorbidades em pacientes HIV;
- Na análise do SNP -2383 C/T do gene FOXP3 não foram encontrados resultados significantes;
- Na análise das dosagens de HLA-G solúvel, nos grupos de genótipo Ins/Ins, os pacientes com e sem comorbidades apresentaram níveis diminuídos de HLA-G solúvel em relação aos controles; e nos grupos de genótipo Ins/Del (excluindo as dosagens dos pacientes sem TARV), os pacientes com comorbidades apresentaram níveis reduzidos HLA-G solúvel em relação aos controles e aos pacientes sem comorbidades. Estes resultados sugerem que a molécula HLA-G pode estar relacionada com a proteção do desenvolvimento de comorbidades em pacientes HIV;
- Nas dosagens de Gal-1 solúvel, o grupo de pacientes com comorbidades de genótipo Ins/Ins apresentou níveis elevados estatisticamente significantes em relação aos grupos de pacientes sem comorbidades Ins/Ins e controles Ins/Ins;
- Pacientes sob TARV com baixos níveis de sHLA-G, com comorbidades e altos níveis de Gal-1 exibiram correlação positiva significativa em relação à carga viral;
- Em conjunto, considerando os resultados encontrados no presente estudo, observa-se que alta expressão de sHLA-G e Gal-1 podem ser associados com melhor ou pior desfecho clínico em PVHIV sob TARV, respectivamente.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, L. M. W.; GONÇALVES, T. R.; BARCELLOS, N. T. Coinfecção HIV/Sífilis na transmissão vertical do HIV: um estudo a partir de dados da vigilância epidemiológica. **Pan American Journal of Public Health**, v. 40, n. 6, 2016.
- ALBUQUERQUE, R. S. et al. Association of HLA-G 3' untranslated region variants with type 1 diabetes mellitus. **Human Immunology**, v. 77, n. 4, p. 358–364, 2016.
- ALENCAR, C. S. et al. HIV genotypes and primary drug resistance among HIV-seropositive blood donors in Brazil: role of infected blood donors as sentinel populations for molecular surveillance of HIV. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 63, n. 3, p. 387-392, jul. 2013.
- ALEGRE, E. et al. Membrane redistributions through multi-intercellular exchanges and serial trogocytosis. **Cell Research**, v. 20, n. 11, p. 1239-1251, nov. 2010.
- AL OMAR, S. Y. et al. Genetic association between the HLA-G 14-bp insertion/deletion polymorphism and the recurrent spontaneous abortions in Saudi Arabian women. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 1, p. 1–2, jan. 2015.
- AMIOT, L. et al. Biology of HLA-G in cancer: a candidate molecule for therapeutic intervention? **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, n. 3, p. 417-431, fev. 2011.
- AMIOT, L. et al. Expression of HLA-G by mast cells is associated with hepatitis C virus-induced liver fibrosis. **Journal of Hepatology**, v. 60, n. 2, p. 245-252, fev. 2014.
- AMIOT, L.; VU, N.; SAMSON, M. Biology of the immunomodulatory molecule HLA-G in human liver diseases. **Journal of Hepatology**, v. 62, n. 6, p. 1430-1437, jun. 2015.
- AMODIO, G. et al. HLA-G expressing DC-10 and CD4(+) T cells accumulate in human decidua during pregnancy. **Human Immunology**, v. 74, n. 4, p. 406-411, abr. 2013.
- AMODIO, G. et al. HLA-G expression levels influence the tolerogenic activity of human DC-10. **Haematologica**, v. 100, n. 4, p. 548-557, abr. 2015.
- AMODIO, G.; GREGORI, S. Human tolerogenic DC-10: Perspectives for clinical applications. **Transplantation Research**, v. 1, n. 1, p. 14, set. 2012.
- ANDERSON, E. et al. HIV-1-associated dementia: a metabolic encephalopathy perpetrated by virus-infected and immune-competent mononuclear phagocytes. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 31, p. S43-S54, 2002.
- ANDRÉ, G. M. et al. Analysis of FOXP3 polymorphisms in infertile women with and without endometriosis. **Fertility and Sterility**, v. 95, n. 7, p. 2223-2227, jun. 2011.
- ANGIN, M. et al. HIV-1 infection impairs regulatory T-cell suppressive capacity on a per-cell basis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 210, n. 6, p. 899-903, 2014.

- ANGINOT, A. et al. Galectin 1 modulates plasma cell homeostasis and regulates the humoral immune response. **The Journal of Immunology**, v. 190, p. 5526-5533, 2013.
- ANTINORI, A. et al. Updated research nosology for HIV-associated neurocognitive disorders. **Neurology**, v. 18, n. 69, p. 1789–1799, out. 2007.
- ANZINGER, J. J. et al. Monocytes as regulators of inflammation and HIV-related comorbidities during cART. **Journal of Immunology Research**, v. 2014, n. 569819, 2014.
- APPAY, V.; DOUEK, D. C.; PRICE, D. A. CD8⁺ T cell efficacy in vaccination and disease. **Nature Medicine**, v. 14, n.6, p. 623–628, jun. 2008.
- APPAY, V.; SAUCE, D. Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. **The Journal of Pathology**, v. 214, n. 2, p. 231–241, jan. 2008.
- ARACTINGI, S. et al. HLA-G and NK receptor are expressed in psoriatic skin: a possible pathway for regulating infiltrating T cells? **The American Journal of Pathology**, v. 159, n. 1, p. 71-77, jul. 2001.
- ARTHUR, C. M. et al. Evolving mechanistic insights into galectin functions. **Methods in Molecular Biology**, v. 1207, p. 1-35, 2015.
- BAETEN, J. M. et al. Genital HIV-1 RNA predicts risk of heterosexual HIV-1 transmission. **Science Translational Medicine**, v. 3, n. 77, p. 1-11, abr. 2011.
- BAKER, J. V. et al. Changes in inflammatory and coagulation biomarkers: a randomized comparison of immediate versus deferred antiretroviral therapy in patients with HIV infection. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome**, v. 56, n. 1, p. 36-43, jan. 2011.
- BARBOSA, C. P. et al. Genetic association study of polymorphisms FOXP3 and FCRL3 in women with endometriosis. **Fertility and Sterility**, v. 97, n. 5, p.1124-1128, mai. 2012.
- BARRÉ-SINOUSSE, F. et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Science**, v. 220, n. 4599, p. 868-871, mai. 1983.
- BARONDES, S. H. et al. Galectins: A family of animal beta-galactoside-binding lectins. **Cell**, v. 76, n. 4, p. 597-598, fev. 1994a.
- BARONDES, S. H. et al. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 33, p. 20807-20810, ago. 1994b.
- BARRIONUEVO, P. et al. A novel function for galectin-1 at the crossroad of innate and adaptive immunity: galectin-1 regulates monocyte/macrophage physiology through a nonapoptotic ERK-dependent pathway. **The Journal of Immunology**, v. 178, p. 436-445, 2007.

BASSUNY, W. M. et al. A functional polymorphism in the promoter/enhancer region of the FOXP3/Scurfin gene associated with type 1 diabetes. **Immunogenetics**, v. 55, n. 3, p. 149–156, jun. 2003.

BASTÓN, J. I. et al. Targeting galectin-1–induced angiogenesis mitigates the severity of endometriosis. **The Journal of Pathology**, v. 234, p. 329–337, 2014.

BIEDRON, M. et al. The role of soluble HLA-G and HLA-G receptors in patients with hematological malignancies after allogeneic stem cell transplantation. **Medical Oncology**, v. 32, n. 8, p. 219, ago. 2015.

BLOIS, S. M. et al. A pivotal role for galectin-1 in fetomaternal tolerance. **Nature Medicine**, v. 13, n. 12, p. 1450–1457, dez. 2007.

BLOIS, S. M. et al. Getting too sweet: galectin-1 dysregulation in gestational diabetes mellitus. **Molecular Human Reproduction**, v. 20, p. 644–649, 2014.

BONZI, J. et al. Pre-B cell receptor binding to galectin-1 modifies galectin-1/carbohydrate affinity to modulate specific galectin-1/glycan lattice interactions. **Nature Communications**, v. 6, p. 6194, fev. 2015.

BORTOLOTTI, D. et al. Pseudomonas aeruginosa Quorum sensing molecule N – (3 oxododecanoyl) – I – Homoserine – Lactone Induces HLA-G expression in Human Immune Cells. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 10, p. 3918–3925, out. 2015.

BOSSOWSKI, A. et al. Analysis of chosen polymorphisms in FoxP3 gene in children and adolescents with autoimmune thyroid diseases. **Autoimmunity**, v. 47, n. 6, p. 395–400, set. 2014.

BOYSON, J. E. et al. Disulfide bond-mediated dimerization of HLA-G on the cell surface. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 25, p. 16180–16185, dez. 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das IST, do HIV/AIDS e das Hepatites Virais. **Boletim Epidemiológico HIV, AIDS**, Brasília, Ano V, n. 1, 2017c. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2017/boletim-epidemiologico-hiv-aids-2017>> Acesso em: 27 ago. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das IST, do HIV/AIDS e das Hepatites Virais. **Indicadores e dados básico da AIDS nos municípios brasileiros**, 2017b. Disponível em: <<http://indicadores.aids.gov.br/>> Acesso em: 27 ago. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais. **Manual Técnico para o Diagnóstico da Infecção pelo HIV**. Brasília, 3ª ed, 2016. Disponível em: <www.aids.gov.br/system/tdf/pub/2016/57787/manual_tecnico_para_o_diagnostico_da_infeccao_pelo_hiv.pdf?file=1&type=node&id=57787&force=1> Acesso em: 5 jul. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das IST, do HIV/AIDS e das Hepatites Virais. **Nota Informativa nº007/2017-DDAHV/SVS/MS**, Fevereiro de 2017. 2017a. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pt-br/legislacao/nota-informativa-no-0072017-ddahv-svs-ms>> Acesso em : 20 ago. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das IST, do HIV/AIDS e das Hepatites Virais. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos**. Brasília, 2018. Disponível em <<http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2013/protocolo-clinico-e-diretrizes-terapeuticas-para-manejo-da-infeccao-pelo-hiv-em-adultos>> Acesso em: 21 jun. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das IST, do HIV/AIDS e das Hepatites Virais. **Relatório de Monitoramento Clínico do HIV 2017**. Brasília, 2017d. Disponível em <http://www.aids.gov.br/sites/default/files/noticia/2017/65068/apresentacao_relmonitclinico_imprensa_24112017_arpp.pdf> Acesso em: 31 ago. 2018.

BRECHLEY, J. M. et al. CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 200, n. 2, p. 749-759, set. 2004.

BRECHLEY, J. M. et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. **Nature Medicine**, v. 12, n. 12, p. 1365–1371, dez. 2006.

BRECHLEY, J. M.; PRICE, D. A.; DOUEK, D. C. HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe? **Nature Immunology**, v.7, n. 3, p. 235–239, mar. 2006.

BROWN, R. et al. CD86+ or HLA-G+ can be transferred via trogocytosis from myeloma cells to T cells and are associated with poor prognosis. **Blood**, v. 120, n. 10, p. 2055-2063, set. 2012.

BROWN, T. T. et al. Loss of bone mineral density after antiretroviral therapy initiation, independent of antiretroviral regimen. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 5, n. 51, p. 554–561, ago, 2009.

BROWN, T. T.; QAQISH, R. B. Antiretroviral therapy and the prevalence of osteopenia and osteoporosis: a meta-analytic review. **AIDS**, v. 17, n. 20, p. 2165–2174, nov. 2006.

BRUNKOW, M. E. Et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. **Nature Genetics**, v. 27, n. 1, p. 68-73, jan. 2001.

CABELLO, A. et al. HAART Induces the Expression of HLA-G on Peripheral Monocytes in HIV-1 Infected Individuals. **Human Immunology**, v. 64, n. 11, p. 1045-1049, nov. 2003.

CAMBY, I. et al. Galectin-1: a small protein with major functions. **Glycobiology**, v. 16, n. 11, p. 137-157, nov. 2006.

CAROSELLA, E. D. et al. HLA-G: An Immune Checkpoint Molecule. **Advances in Immunology**, v. 127, p. 33-144, mai. 2015.

CAROSELLA, E. D. et al. HLA-G: A shield against inflammatory aggression. **Trends in Immunology**, v. 22, n. 10, p. 553-555, out. 2001.

CARVALHO, C. M. L.; BARROSO, L. M. M.; GALVÃO, M. T. G. Mulheres com HIV/Aids: subsídios para a prática de enfermagem. **Revista da Rede de Enfermagem do Nordeste**, v. 2, n. 7, p. 98-105, mai. 2006.

CARVALHO, C. M. L. et al. Assistência à saúde da mulher portadora do HIV/AIDS no Brasil: refletindo sobre as políticas públicas. **Revista da Rede de Enfermagem do Nordeste**, v. 9, n. 3, p. 125-134, jul. 2008.

CASTELLI, E.C. et al. In silico analysis of microRNAs targeting the HLA-G 3' untranslated region alleles and haplotypes. **Human Immunology**, v. 70, p. 1020-1025, 2009.

CAUMARTIN, J. et al. Trogocytosis-based generation of suppressive NK cells. **The EMBO Journal**, v. 26, n. 5, p. 1423-1433, mar. 2007.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **REVISED SURVEILLANCE CASE DEFINITIONS FOR HIV INFECTION AMONG ADULTS, ADOLESCENTS, AND CHILDREN AGED <18 MONTHS AND FOR HIV INFECTION AND AIDS AMONG CHILDREN AGED 18 MONTHS TO <13 YEARS — UNITED STATES**, 2008. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5710a1.htm>>. Acesso em: 18 mai. 2016.

CERLIANI, J. P. et al. Translating the 'sugar code' into immune and vascular signaling programs. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 42, n. 4, p. 255-273, abr. 2017.

CHEN, X. Y. et al. The 14 bp deletion polymorphisms in HLA-G gene play an important role in the expression of soluble HLA-G in plasma. **Tissue Antigens**, v. 72, n. 4, p. 335-341, out. 2008.

CHIARIOTTI, L. et al. Galectin genes: regulation of expression. **Glycoconjugate Journal**, v. 19, p. 441-449, 2004.

CIRULLI, V. et al. The class I HLA repertoire of pancreatic islets comprises the nonclassical class Ib antigen HLA-G. **Diabetes**, v. 55, n. 5, p. 1214-1222, mai. 2006.

CLARK, G. F. ; SCHUST, D. J. Manifestations of immune tolerance in the human female reproductive tract. **Frontiers in Immunology**, v. 4, n. 26, fev. 2013.

COFFER, P. J.; BURGERING, B. M. Forkhead-box transcription factors and their role in the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 11, p. 889-899, nov. 2004.

COHEN, M. S. et al. The detection of acute HIV infection. **The Journal of Infectious Disease**, v. 202, n. 2, p. 270-277, out. 2010.

COHEN, R. A; SEIDER, T. R.; NAVIA, B. HIV effects on age-associated neurocognitive dysfunction: premature cognitive ageing or neurodegenerative disease? **Alzheimer's Research & Therapy**, n.7, p. 37, 2015.

COLLIN, F. et al. Ten-year incidence and risk factors of bone fractures in a cohort of treated HIV1-infected adults. **AIDS**, v. 8, n. 23, p. 1021–1024, mai. 2009.

COLONNA, M. et al. A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 186, n. 11, p. 1809-1818, dez. 1997.

COLONNA, M. et al. Human myelomonocytic cells express an inhibitory receptor for classical and non classical MHC class I molecules. **Journal of Immunology**, v. 160, n. 7, p. 3096-3100, abr. 1998.

CONNOR, R. I. et al. Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1 infected individuals. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 185, n. 4, p. 621–628, fev. 1997.

CONTINI, P. et al. Soluble HLA-A,-B,-C and -G molecules induce apoptosis in T and NK CD8+ cells and inhibit cytotoxic T cell activity through CD8 ligation. **European Journal of Immunology**, v. 33, n. 1, p. 125-134, jan. 2003.

COOPER, D. ; NORLING, L. V. ; PERRETTI, M. Novel insights into the inhibitory effects of galectin-1 on neutrophil recruitment under flow. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 83, p. 1459-1466, 2008.

COURTIN, D. et al. HLA-G 3' UTR-2 haplotype is associated with Human African trypanosomiasis susceptibility. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 17, p. 1–7, 2013.

CROCI, D. O. et al. Disrupting galectin-1 interactions with N-glycans suppresses hypoxia-driven angiogenesis and tumorigenesis in Kaposi's sarcoma. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 209, p. 1985-2000, out. 2012.

CROCI, D. O. et al. Glycosylation-dependent lectin-receptor interactions preserve angiogenesis in anti-VEGF refractory tumors. **Cell**, v. 156, n. 4, p. 744-758, fev. 2014.

D'AMELIO, P. et al. Estrogen deficiency increases osteoclastogenesis up-regulating T cells activity: a key mechanism in osteoporosis. **Bone**, v. 43, n. 1, p. 92–100, jul. 2008.

DALGLEISH, A. G. et al. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. **Nature**, v. 312, n. 5996, p. 763–767, dez. 1984.

DAVICINO, R. C. et al. Galectin-1–driven tolerogenic programs aggravate *Yersinia enterocolitica* infection by repressing antibacterial immunity. **The Journal of Immunology**, v. 199, p. 1382-1392, jul. 2017.

DAY, C. L. et al. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. **Nature**, v. 443, n. 7109, p. 350–354, set. 2006.

- DE LA FUENTE, H. et al. The leukocyte activation receptor CD69 controls cell differentiation through its interaction with galectin-1. **Molecular and Cellular Biology**, v. 34, n. 13, p. 2479-2487, jul. 2014.
- DEAN, M. et al. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the *CCR5* structural gene. **Science**, v. 273, n. 5283, p. 1856–1862, set. 1996.
- DEEKS, S. G. et al. HIV infection. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, n. 15035, p. 1-22, out. 2015.
- DERRIEN, M. et al. Human immunodeficiency virus 1 downregulates cell surface expression of the non-classical major histocompatibility class I molecule HLA-G1. **The Journal of General Virology**, v. 85, n. 7, p.1945–1954, jul. 2004
- DETTIN, L. et al. Regulated expression and ultrastructural localization of galectin-1, a proapoptotic beta-galactoside-binding lectin, during spermatogenesis in rat testis. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 51-59, 2003.
- DOITSH, G. et al. Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. **Nature**, v. 505, n. 7484, p. 509-514, jan. 2014.
- DOMS, R.W. Beyond receptor expression: the influence of receptor conformation, density and affinity in HIV-1 infection. **Virology**, v. 276, n.2, p. 229-237, out. 2000.
- DONADI, E. A. et al. Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, n. 3, p. 369–395, 2011.
- DONAGHY, L. et al. Elevated levels of soluble non-classical major histocompatibility class I molecule human leucocyte antigen (HLA)-G in the blood of HIV-infected patients with or without visceral leishmaniasis. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 147, n. 2, p. 236–240, fev. 2007.
- DONG, Y. et al. Soluble nonclassical HLA generated by the metalloproteinase pathway. **Human Immunology**, v. 64, n. 8, p. 802-810, ago. 2003.
- DRELICHOWSKA, J. K. W.; KNYSZA, B.; WITKIEWICZA, W. Metabolic syndrome in HIV-positive patients. **HIV & AIDS Review**, n. 14, 2015.
- DUPREZ, D. A. et al. Inflammation, coagulation and cardiovascular disease in HIV-infected individuals. **PLoS One**, v. 7, n. 9, 2012.
- ENGELMAN, A.; CHEREPANOV, P. The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. **Nature Review Microbiology**, v. 10, n. 4, p. 279-290, mar. 2012.
- ENGHELABIFAR, M. et al. Association of the maternal 14-bp insertion/deletion polymorphism in the histocompatibility leukocyte antigen G gene with recurrent implantation failure. **Iranian Journal of Reproductive Medicine**, v. 12, n. 9, p. 641-646, 2014.

ERLANDSON, K. M.; GUARALDI, G; FALUTZ, J. More than osteoporosis: age-specific issues in bone health. **Current Opinion in HIV and AIDS**, v.3, n. 11, p. 343–350, mai. 2016.

ESKANDARI-NASAB, E. et al. Association between HLA-G 3'UTR 14-bp ins/del polymorphism and susceptibility to breast cancer. **Cancer biomarkers: Section A Disease markers**, v. 13, n. 4, p. 253-259, 2013.

FABRIS, A. et al. Association between HLA-G 3'UTR 14-bp polymorphism and HIV vertical transmission in Brazilian children. **AIDS**, v. 23, n. 2, p. 177-182, jan. 2009.

FAKRUDDIN, J. M.; LAURENCE, J. HIV-1 Vpr enhances production of receptor of activated NF-kappaB ligand (RANKL) via potentiation of glucocorticoid receptor activity. **Archives of Virology**, v. 1, n. 150, p. 67–78, jan. 2005.

FANTUZZI, G. et al. Response to local inflammation of IL-1 beta-converting enzyme-deficient mice. **Journal of Immunology**, v. 158, n. 4, p.1818-1824, fev. 1997.

FENG, Y. et al. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. **Science**, v. 272, n. 5263, p. 872–877, mai. 1996.

FIEBIG, E. W. et al. Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. **AIDS**, v. 17, n. 13, p. 1871–1889, set. 2003.

FONTENOT, J. D. et al. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. **Immunity**, v. 22, n. 3, p. 329-341, mar. 2005.

FRIIS-MOLLER, N.; REISS, P.; SABIN, C. A. Data Collection on Adverse Events of Anti-HIV Drugs (DADS) Study Group *et al.* Class of antiretroviral drugs and the risk of myocardial infarction. **The New England Journal of Medicine**, n. 356, p.1723–1735, 2007.

FUERTE, M. B. et al. Regulated expression of galectin-1 during T-cell activation involves Lck and Fyn kinases and signaling through MEK1/ERK, p38 MAP kinase and p70S6 kinase. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 267, p. 177-185, 2004.

GALLO, R. C. et al. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Science**, v. 220, n. 4599, p. 865–867, mai. 1983.

GALVIN, S. R.; COHEN, M. S. The role of sexually transmitted diseases in HIV transmission. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n.1, p. 33-42, jan. 2004.

GAMBINERI, E.; TORGERSON, T. R.; OCHS, H. D. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 15, n. 4, p. 403-405, jun. 2003.

GARÍN, M. I. et al. Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. **Blood**, v. 109, p. 2058-2065, 2007.

GBD. GLOBAL BURDEN OF DISEASE STUDY. **GLOBAL, REGIONAL, AND NATIONAL AGE-SEX SPECIFIC ALL-CAUSE AND CAUSE-SPECIFIC MORTALITY FOR 240 CAUSES OF DEATH, 1990–2013: A SYSTEMATIC ANALYSIS FOR THE GLOBAL BURDEN OF DISEASE STUDY**, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673614616822?via%3Dihub>>. Acesso em: 17 abr. 2016.

GBD. GLOBAL BURDEN OF DISEASE STUDY. **GLOBAL, REGIONAL, AND NATIONAL LIFE EXPECTANCY, ALL-CAUSE MORTALITY, AND CAUSE-SPECIFIC MORTALITY FOR 249 CAUSES OF DEATH, 1980–2015: A SYSTEMATIC ANALYSIS FOR THE GLOBAL BURDEN OF DISEASE STUDY**, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5388903/pdf/main.pdf>>. Acesso em: 24 ago. 2017.

GE, X. N. et al. Regulation of eosinophilia and allergic airway inflammation by the glycan-binding protein galectin-1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.113, p. E4837-E4846, 2016.

GE, Y.Z. et al. Association between human leukocyte antigen-G 14-bp insertion/deletion polymorphism and cancer risk: a meta-analysis and systematic review. **Human Immunology**, v. 75, p. 827–832, 2014.

GEIJTENBEEK, T. B. H. et al. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans- infection of T cells. **Cell**, v. 100, n. 5, p. 587-597, mar. 2000.

GENRE, J. et al. HLA-G 14-bp Ins/Ins Genotype in Patients Harboring Helicobacter pylori Infection: A Potential Risk Factor? **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 83, n. 1, p. 52–57, 2016.

GERAGHTY, D. E.; KOLLER, B. H.; ORR, H. T. A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, n. 24, p. 9145–9149, ago. 1987.

GERASIMOU, P. et al. HLA-G 14-bp polymorphism affects the age of onset in Type I Diabetes Mellitus. **International Journal of Immunogenetics**, v. 43, n. 3, p. 135–142, 2016.

GHAFOURI, M. et al. HIV-1 associated dementia: symptoms and causes. **Retrovirology**, n.3, p. 28, mai. 2006.

GIBELLINI, D. et al. HIV-1 triggers apoptosis in primary osteoblasts and HOBIT cells through TNFalpha activation. **Journal of Medical Virology**, v.9, n. 80, p.1507–1514, set. 2008.

GIBELLINI, L. et al. Different origin of adipogenic stem cells influences the response to antiretroviral drugs. **Experimental Cell Research**, v. 337, n. 2, p. 160-169, out. 2015.

GILLS, J. J. et al. Nelfinavir, A lead HIV protease inhibitor, is a broad-spectrum, anticancer agent that induces endoplasmic reticulum stress, autophagy, and apoptosis in vitro and in vivo. **Clinical Cancer Research**, v. 13, p. 5183-5194, 2007)

GOMES, J. G. N. et al. Genetic polymorphisms of Foxp3 and IL-17A in inflammatory periodontal disease. **Journal of Dental and Medical Sciences**, v. 15, n. 11, p. 39-45, nov. 2016.

GONEN-GROSS, T. et al. The CD85J/leukocyte inhibitory receptor-1 distinguishes between conformed and β 2-microglobulin-free HLA-G molecules. **Journal of Immunology**, v. 175, n. 8, p. 4866-4874, out. 2005.

GONGVATANA, A. et al. Progressive cerebral injury in the setting of chronic HIV infection and antiretroviral therapy. **Journal of Neurovirology**, v.3, n. 19, p. 209–218, jun. 2013.

GOUGEON, M. L. et al. Adipocytes targets and actors in the pathogenesis of HIV-associated lipodystrophy and metabolic alterations. **Antiviral therapy**, v. 2, n. 9, p. 161-177, abr. 2004.

GREGORI, S. et al. Differentiation of type 1 T regulatory cells (Tr1) by tolerogenic DC-10 requires the IL-10-dependent ILT4/HLA-G pathway. **Blood**, v. 116, n. 6, p. 935-944, ago. 2010.

GROS, F. et al. Soluble HLA-G molecules impair natural killer/dendritic cell crosstalk via inhibition of dendritic cells. **European Journal of Immunology**, v. 38, n. 3, p. 742-749, mar. 2008.

GRULICH, A. E. et al. Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis. **Lancet**, v. 9581, n. 370, p. 59–67, jul. 2007.

GUARALDI, G. et al. Coronary ageing in HIV-infected patients. **Clinical Infectious Diseases**, n. 49, p. 1756-1762, 2009.

GUARALDI, G. et al. Morbidity in older HIV-infected patients: impact of long-term antiretroviral use. **AIDS Review**, v. 2, n. 16, p. 75-89, abr. 2014.

GUARALDI, G.; SILVA, A. R.; STENTARELLI, C. Multimorbidity and functional status assesment. **Current Opinion in HIV and AIDS**, v. 3, n. 9, p. 386-397, jul. 2014.

GUMA, M. et al. Caspase 1-independent activation of interleukin-1beta in neutrophil-predominant inflammation. **Arthritis and Rheumatism**, v. 60, n. 12, p. 3642-3650, dez. 2009.

GURUNATHAN, S. et al. Use of predictive markers of HIV disease progression in vaccine trials. **Vaccine**, v. 27, n. 14, p. 1997-2015, mar. 2009.

HAASE, A. T. Perils at mucosal front lines for HIV and SIV and their hosts. **Nature Review Immunology**, v. 5, n. 10, p. 783–792, out. 2005.

HAGHI, M. et al. 14-bp Insertion / Deletion Polymorphism of the HLA-G gene in Breast Cancer among Women from North Western Iran. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 16, p. 6155–6158, 2015.

HAHN, B. H. et al. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. **Science**, v. 287, n. 5453, p. 607-614, jan. 2000.

HANEL, S. A. et al. Novel and functional regulatory SNPs in the promoter region of FOXP3 gene in a Gabonese population. **Immunogenetics**, v. 63, n. 3, p. 409–415, jul. 2011.

HARMAN, D. et al. Free radical theory of aging: effect of dietary fat on central nervous system function. **Journal of American Geriatrics Society**, v. 24, n. 7, p. 301-307, jul 1976.

HASELTINE, W. A. Molecular biology of the human immunodeficiency virus type 1. **FASEB Journal: official publication of Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 5, n. 10, p. 2349-2360, jul. 1991.

HASHEMI, M. et al. Evaluation of HLA-G 14 bp Ins/Del and +3142G>C Polymorphism with Susceptibility and Early Disease Activity in Rheumatoid Arthritis. **Hindawi Publishing Corporation**, p. 1 - 7, 2016.

HEMELAAR, J. The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. **Trends in Molecular Medicine**, v. 18, n.3 p. 182-192, mar. 2012.

HIBY, S. E. et al. Molecular studies of trophoblast HLA-G: polymorphism, isoforms, imprinting and expression in preimplantation embryo. **Tissue Antigens**, v. 53, n. 1, p. 1–13, 1999.

HJALGRIM, H. ; ENGELS, E. A. Infectious aetiology of Hodgkin and non-Hodgkin lymphomas: a review of the epidemiological evidence. **Journal of Internal Medicine**, v. 6, n. 264, p. 537–548, dez. 2008.

HONG, H. A. et al. Maternal human leukocyte antigen-G (HLA-G) genetic variants associate with in utero mother-to-child transmission of HIV-1 in Black South Africans. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 30, p. 147–158, mar. 2015.

HOWANGYIN, K. Y. et al. Different functional outcomes of intercellular membrane transfers to monocytes and T cells. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 7, p. 1133-1145, abr. 2010.

HOWANGYIN, K. Y. et al. Multimeric structures of HLA-G isoforms function through differential binding to LILRB receptors. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 69, n. 23, p. 4041-4049, dez. 2012.

HSU, P.; NANAN, R. K. Innate and adaptive immune interactions at the fetalmaternal interface in healthy human pregnancy and pre-eclampsia. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. 125, mar. 2014.

HUANG, J. et al. Soluble HLA-G inhibits myeloid dendritic cell function in HIV-1 infection by interacting with leukocyte immunoglobulin-like receptor B2. **Journal of Virology**, v. 84, n. 20, p. 10784-10791, out. 2010.

HUEHN, J.; POLANSKY, J. K.; HAMANN, A. Epigenetic control of FOXP3 expression: the key to a stable regulatory T-cell lineage? **Nature Review Immunology**, v. 9, n. 2, p. 83–89, fev. 2009.

HVIID, T. V. F. et al. HLA-G allelic variants are associated with differences in the HLA-G mRNA isoform profile and HLA-G mRNA levels. **Immunogenetics**, v. 55, n. 2, p. 63–79, 2003.

ILARREGUI, J. M. et al. Tolerogenic signals delivered by dendritic cells to T cells through a galectin-1-driven immunoregulatory circuit involving interleukin 27 and interleukin 10. **Nature Immunology**, v. 10, p. 981-991, 2009.

IMAMICHI, H.; LANE, H. C. Regulatory T cells in HIV-1 infection: the good, the bad, and the ugly. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 205, n. 10, p. 1479-1482, mai. 2012.

IMGT. INTERNATIONAL IMMUNOGENETICS PROJECTS. **HLA-G NUCLEOTIDE SEQUENCE ALIGNMENTS**, 2016. Disponível em: <https://raw.githubusercontent.com/ANHIG/IMGTHLA/Latest/alignments/G_nuc.txt>. Acesso em: 27 ago. 2017.

IN, J. W. et al. Association of aplastic anemia and FoxP3 gene polymorphisms in Koreans. **Hematology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 22, n. 33, p. 149-154, abr. 2017.

INCA. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉALENCAR GOMES DA SILVA. **INCIDÊNCIA DE CÂNCER NO BRASIL ESTIMATIVA 2018**, 2018. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/casos-taxas-brasil.asp>>. Acesso em: 06 set. 2018.

INOUE, N. et al. Association of functional polymorphisms related to the transcriptional level of FOXP3 with prognosis of autoimmune thyroid diseases. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 162, n. 3, p. 402-406, dez. 2010.

ISHITANI, A; GERAGHTY, D. E. Alternative splicing of HLA-G transcripts yields proteins with primary structures resembling both class I and class II antigens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 9, p. 3947–3951, mai. 1992.

JANISZEWSKI, P. M. et al. Hypertriglyceridemia and waist circumference predict cardiovascular risk among HIV patients: a cross-sectional study. **PLoS One**, v. 9, n. 6, set. 2011.

JEONG, S. et al. Human leukocyte antigen-G (HLA-G) polymorphism and expression in breast cancer patients. **PLoS one**, v. 28, n. 9, p. 1 - 10, 2014.

JIANG, L. L.; RUAN, L. W. Association between FOXP3 promoter polymorphisms and cancer risk: A meta-analysis. **Oncology Letters**, v. 8, n. 6, p. 2795-2799, dez. 2014.

JIANG, Y. et al. 3' UTR 14-bp Insertion/Deletion Polymorphism with Hepatocellular Carcinoma Susceptibility in a Chinese Population. **DNA and Cell Biology**, v. 30, n. 12, p. 1027–1032, 2011.

JOLY, E.; HUDRISIER, D. What is trogocytosis and what is its purpose? **Nature Immunology**, v. 4, n. 9, p. 815, set. 2003.

JOOSTEN, L. A. et al. Inflammatory arthritis in caspase 1 gene-deficient mice: contribution of proteinase 3 to caspase 1-independent production of bioactive interleukin-1beta. **Arthritis and Rheumatism**, v. 60, n. 12, p. 3651–3662, dez. 2009.

KANAI, T. et al. A subclass of soluble HLA-G1 modulates the release of cytokines from mononuclear cells present in the decidua additively to membrane-bound HLA-G1. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 60, n. 2, p. 85–96, dez. 2003.

KANAI, T. et al. Human leukocyte antigen-G-expressing cells differently modulate the release of cytokines from mononuclear cells present in the decidua versus peripheral blood. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 45, n. 2, p. 94–99, fev. 2001a.

KANAI, T. et al. Soluble HLA-G influences the release of cytokines from allogeneic peripheral blood mononuclear cells in culture. **Molecular Human Reproduction**, v. 7, n. 2, p. 195–200, fev. 2001b.

KAUFMANN, D. E. et al. Upregulation of CTLA-4 by HIV-specific CD4⁺ T cells correlates with disease progression and defines a reversible immune dysfunction. **Nature Immunology**, v. 8, n. 11, p. 1246–1254, nov. 2007.

KELLEY, C. F; BARBOUR, J. D.; HECHT, F. M. The relation between symptoms, viral load, and viral load set point in primary HIV infection. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome**, v. 45, n. 4, p. 445–448, ago. 2007.

KENGNE, A. P. et al. Cardiovascular diseases and diabetes as economic and developmental challenges in Africa. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 3, n. 56, p. 302–313, nov. 2013.

KHOSROTEHRANI, K. et al. HLA-G expression in atopic dermatitis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 117, n. 3, p. 750–752, abr. 2001.

KIM, S.H. et al. Relationship between the HLA-G 14bp insertion/deletion polymorphism and susceptibility to autoimmune disease: a meta-analysis. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 4, p. 15839–15847, 2015.

KINTER, A. L. et al. CD25+regulatory T cells isolated from HIV-infected individuals suppress the cytolytic and nonlytic antiviral activity of HIV-specific CD8+T cells in vitro. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 23, n. 3, p. 430–450, mar. 2007.

KIRK, G. D. et al. HIV infection is associated with an increased risk for lung cancer, independent of smoking. **Clinical Infectious Diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 1, n. 45, p. 103–110, jul. 2007.

KLATZMANN, D. et al. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature*, v. 312, n. 5996, p. 767–768, dez. 1984.

KLEINMAN, A. J. Regulatory T Cells As Potential Targets for Hiv Cure Research. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. 734, abr. 2018.

KLIMAS, N.; KONERU, A. O.; FLETCHER, M. A. Overview of HIV. **Psychosomatic Medicine**, v. 70, n. 5, p. 523-530, jun. 2008.

KOLLER, B. H. et al. Chromosomal organization of the human major histocompatibility complex class I gene family. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 169, n. 2, p. 469–480, fev. 1989.

KOUP, R. A. et al. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. **Journal of Virology**, v. 68, n. 7, p. 4650–4655, jul. 1994.

KOVATS, S et al. A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. **Science**, v. 248, n. 4952, p. 220-223, abr. 1990.

KULLER L. H. et al. Inflammatory and coagulation biomarkers and mortality in patients with HIV infection. **PLoS Medicine**, v. 5, n. 10, p. 203, out. 2008.

LAARIBI, A. B. et al. Association of an HLA-G 14-bp Insertion/Deletion polymorphism with high HBV replication in chronic hepatitis. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 22, n. 10, p. 835–841, out. 2015.

LACKNER, A. A.; LEDERMAN, M. M.; RODRIGUEZ, B. HIV pathogenesis: the host. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, n. 2, p. 1-22, abr. 2012.

LAFON, M. et al. Modulation of HLA-G expression in human neural cells after neurotropic viral infections. **Journal of Virology**, v. 79, n. 24, p. 15226-15237, dez. 2005.

LAJOIE, J. et al. Persistence of high levels of blood soluble human leukocyte antigen-G is associated with rapid progression of HIV infection. **AIDS**, v. 23, n. 11, p. 1437–1440, jul. 2009.

LAN, Y. et al., [Association of transcription factor FOXP3 gene polymorphism with genetic susceptibility to systematic lupus erythematosus in Guangxi Zhuang population]. **Chinese Journal of Medical Genetics**, v. 27, n. 4, p. 433-436, ago. 2010.

LARSON, M. H. et al. HLA-G 3' untranslated region 14-base pair deletion: association with poor survival in an HIV-1-infected Zimbabwean population. **Journal of Infectious Disease**, v. 207, n. 6, p. 903-906, mar. 2013.

LAWN, S. D.; BUTERA, S. T.; FOLKS, T. M. Contribution of immune activation to the pathogenesis and transmission of human immunodeficiency virus type 1 infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 4, p. 753-777, out. 2001.

LE DISCORDE, M. et al. Expression of HLA-G in human cornea, an immune-privileged tissue. **Human Immunology**, v. 64, n. 11, p. 1039-1044, nov. 2003.

LEFFLER, H. et al. Introduction to galectins. **Glycoconjugate Journal**, v.19, p. 433-440, 2004.

LE GAL, F. A. et al. HLA-G-mediated inhibition of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. **International Immunology**, v. 11, n. 8, p. 1351-1356, ago. 1999.

LEMAOULT, J. et al. Immune regulation by pretenders: Cell-to-cell transfers of HLA-G make effector T cells act as regulatory cells. **Blood**, v. 109, n. 5, p. 2040-2048, mar. 2007.

LESPORT, E. et al. Inhibition of human gamma delta [corrected] T-cell antitumoral activity through HLA-G: Implications for immunotherapy of cancer. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, n. 20, p. 3385-3399, out. 2011.

LETENDRE, S. L. et al. Enhancing antiretroviral therapy for human immunodeficiency virus cognitive disorders. **Annals of Neurology**, v. 3, n. 56, p. 416–423, set. 2004.

LI, C. et al. Functional characterization of HLA-G⁺ regulatory T cells in HIV-1 infection. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 1, p. 1-11, jan. 2013.

LI, Q. et al. Visualizing antigen-specific and infected cells in situ predicts outcomes in early viral infection. **Science**, v. 323, n. 5922, p. 1726-1729, mar. 2009.

LIANG, S.; BAIBAKOV, B.; HORUZSKO, A. HLA-G inhibits the functions of murine dendritic cells via the PIR-B immune inhibitory receptor. **European Journal of Immunology**, v. 32, n. 9, p. 2418-2426, set. 2002.

LILA, N. et al. Implication of HLA-G molecule in heart-graft acceptance. **The Lancet**, v. 355, n. 9221, p. 2138, jun. 2000.

LILA, N. et al. Soluble HLA-G protein secreted by allo-specific CD4⁺ T cells suppresses the allo-proliferative response: A CD4⁺ T cell regulatory mechanism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 21, p. 12150-12155, out. 2001.

LIN, A.; YAN, W.H. Human Leukocyte Antigen-G (HLA-G) Expression in Cancers: Roles in Immune Evasion, Metastasis and Target for Therapy. **Molecular Medicine**, v. 21, p. 782-791, 2015.

LINKERMANN, A. et al. Regulated cell death and inflammation: an auto-amplification loop causes organ failure. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 11, p.759-767, nov. 2014.

LITTLE, S. J. et al. Viral dynamics of acute HIV-1 infection. **Journal of Experimental Medicine**, v. 190, n. 6, p. 841–850, set. 1999.

LIU, R. et al. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. **Cell**, v 86, n. 3, p. 367–377, ago. 1996.

LIU, X.; LIEBERMAN, J. A Mechanistic Understanding of Pyroptosis: The Fiery Death Triggered by Invasive Infection. **Advances in Immunology**, n. 135, p. 81-117, 2017.

LOZANO, J. M. et al. Monocytes and T lymphocytes in HIV-1-positive patients express HLA-G molecule. **AIDS**, v. 16, n. 3, p. 347-351, fev. 2002.

LOZANO, J. M. et al. CD8(+)HLA-G(+) regulatory T cells are expanded in HIV-1-infected patients. **Viral Immunology**, v. 22, n. 6, p. 463-465, dez 2009.

LUSTER, A. D.; ALON, R.; VON ANDRIAN, U. H. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. **Nature Immunology**, v. 6, n. 12, p. 1182-1190, dez. 2005.

LV, Z.; CHU, Y.; WANG, Y. HIV protease inhibitors: a review of molecular selectivity and toxicity. **HIV AIDS (Auckland, N. Z.)**, v. 7, p. 95-104, abr. 2015.

MADDON, P. J. et al. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. **Cell**, v. 47, n. 3, p. 333-348, nov. 1986.

MAEDA, M. et al. Murine CD160, Ig-like receptor on NK cells and NKT cells, recognizes classical and nonclassical MHC class I and regulates NK cell activation. **Journal of Immunology**, v. 175, n. 7, p. 4426-4432, out. 2005.

MALLET, V. et. al. HLA-G in the human thymus: a subpopulation of medullary epithelial but not CD83(+) dendritic cells expresses HLA-G as a membrane-bound and soluble protein. **International Immunology**, v. 11, n. 6, p. 889-898, fev. 1999.

MALOY, K. J.; POWRIE, F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. **Nature Immunology**, v. 2, n. 9, p. 816-822, set. 2001.

MANTEL, P. Y. et al. Molecular mechanisms underlying FOXP3 induction in human T cells. **Journal of Immunology**, v. 176, n. 6, p. 3593-3602, mar. 2006.

MARIATHASAN, S. et al. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. **Nature**, v. 440, n. 7081, p. 228-232, mar. 2006.

MARTELLI-PALOMINO, G. et al. Polymorphic sites at the 3' untranslated region of the HLA-G gene are associated with differential hla-g soluble levels in the Brazilian and French population. **PLoS One**, v. 8, n. 10, out. 2013.

MARTÍNEZ-BOSCH, N. et al. Galectin-1 drives pancreatic carcinogenesis through stroma remodeling and Hedgehog signaling activation. **Cancer Research**, v. 74, p. 3512-3524, 2014.

MATTSON, M. P.; HAUGHEY, N. J.; NATH, A. Cell death in HIV dementia. **Cell Death and Differentiation**, v. 12, p. 1893-1904, ago. 2005.

MCMICHAEL, A. et al. The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 1, p. 11-23, jan. 2010.

MELLORS, J. W. et al. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. **Science**, v. 272, n. 5265, p. 1167–1170, mai. 1996.

MENIER, C. et al. Erythroblasts secrete the nonclassical HLA-G molecule from primitive to definitive hematopoiesis. **Blood Journal**, v. 104, n. 10, p. 3153–3160, nov. 2004.

MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 3, p. 1215, fev. 1988.

MOCROFT, A. et al. Normalisation of CD4 counts in patients with HIV-1 infection and maximum virological suppression who are taking combination antiretroviral therapy: an observational cohort study. **Lancet**, v. 9585, n. 370, p. 407–413, ago. 2007.

MOIR, S. et al. Evidence for HIV-associated B cell exhaustion in a dysfunctional memory B cell compartment in HIV-infected viremic individuals. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 205, n. 8, p. 1797–1805, ago. 2008.

MOIR, S.; CHUN, T. W.; FAUCI, A. S. Pathogenic mechanisms of HIV disease. **Annual Review of Pathology**, v. 6, p. 223–248, fev. 2011.

MOIR, S.; FAUCI, A. S. B cells in HIV infection and disease. **Nature Review Immunology**, v. 9, n. 4, p. 235–245, abr. 2009.

MONROE, K. M. et al. IFI16 DNA sensor is required for death of lymphoid CD4 T cells abortively infected with HIV. **Science**, v. 343, n. 6169, p. 428–432, jan. 2014.

MONSIVAIS-URENDA, A. E. et al. Expression and functional role of HLA-G in immune cells from patients with systemic lupus erythematosus. **Journal of Clinical Immunology**, v. 31, n. 3, p. 369–378, jun. 2011.

MORANDI, F. et al. Soluble HLA-G dampens CD94/NKG2A expression and function and differentially modulates chemotaxis and cytokine and chemokine secretion in CD56bright and CD56dim NK cells. **Blood**, v. 118, n. 22, p. 5840–5850, nov. 2011.

MOREAU, P. et al. IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes. **International Immunology**, v. 11, n. 5, p. 803–811, mai. 1999.

MORENO-FERNANDEZ, M. E. et al. Human regulatory T cells are targets for human immunodeficiency virus (HIV) infection, and their susceptibility differs depending on the HIV type 1 strain. **Journal of Virology**, n. 83, v. 24, p. 12925–12933, dez. 2009.

MURATA, H.; HRUZ, P. W.; MUECKLER, M. Indinavir inhibits the glucose transporter isoform Glut4 at physiologic concentrations. **AIDS**, v. 16, n. 6, p. 856–863, abr. 2002.

MURDACA, G. et al. Behavior of non-classical soluble HLA class G antigens in human immunodeficiency virus 1-infected patients before and after HAART: comparison with classical soluble HLA-A, -B, -C antigens and potential role in immune-reconstitution. **Clinical Immunology**, v. 133, n. 2, p. 238–244, nov. 2009.

MURDACA, G. et al. Immunoregulatory Role of HLA-G in Allergic Diseases. **Journal of Immunology Research**, jun. 2016.

MURDACA, G. et al. Soluble human leukocyte antigen-G serum levels in patients with acquired immune deficiency syndrome affected by different disease-defining conditions before and after antiretroviral treatment. **Human Immunology**, v. 72, n. 9, p. 712-716, set. 2011.

NAEGER, D. M. et al. Cytomegalovirus-specific T cells persist at very high levels during long-term antiretroviral treatment of HIV disease. **PloS One**, v. 5, n. 1, p. 8886, jan. 2010

NAJI, A. et al. Binding of HLA-G to ITIM-bearing Ig-like transcript 2 receptor suppresses B cell responses. **Journal of Immunology**, v. 192, n. 4, p. 1536-1546, fev. 2014.

NAM, M. et al. Association of FOXP3 Single Nucleotide Polymorphisms With Clinical Outcomes After Allogenic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. **Annals of Laboratory Medicine**, v. 38, n. 6, p. 591-598, nov. 2018.

NASI, M. et al. Ageing and inflammation in patients with HIV infection. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 187, n. 1, p. 44-52, 2016.

NASI, M. et al. Decreased mitochondrial DNA content in subcutaneous fat from HIV-infected women taking antiretroviral therapy as measured at delivery. **Antiviral Therapy**, v. 16, n. 3, p. 365-372, 2011.

NASI, M. et al. Persistent inflammation in HIV infection: established concepts, new perspectives. **Immunology Letters**, v. 161, n. 2, p. 184-188, jan. 2014.

NATHAN, C.; DING, A. Nonresolving inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 871-882, mar. 2010.

ODA, J. M. et al. Genetic polymorphism in FOXP3 gene: imbalance in regulatory T-cell role and development of human diseases. **Journal of Genetics**, v. 92, n.1, p. 163-171, abr. 2013.

OLIVEIRA SOUZA, D. M. B. et al. Upregulation of soluble HLA-G5 and HLA-G6 isoforms in the milder histopathological stages of *Helicobacter pylori* infection: A role for subverting immune responses? **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 83, n. 1, p. 38-43, jan. 2016.

PABALAN, N. et al. Meta-analysis of the human leukocyte antigen-G (HLA-G) 14 bp insertion/deletion polymorphism as a risk factor for preeclampsia. **Tissue Antigens**, v. 86, n. 3, p. 186-194, 2015.

PAO, V.; LEE, G. A.; GRUNFELD, C. HIV therapy, metabolic syndrome, and cardiovascular risk. **Current Atherosclerosis Reports**, v. 1, n. 10, p. 61-70, fev. 2008.

PARRISH, N. F. et al. Phenotypic properties of transmitted founder HIV-1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 17, p. 6626-6633, abr. 2013.

PATEL, P. et al. Estimating per-act HIV transmission risk: a systematic review. **AIDS**, v. 28, n. 10, p. 1509–1519, jun. 2014.

PAUL, P. et al. HLA-G expression in melanoma: a way for tumor cells to escape from immunosurveillance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 8, p. 4510-4515, abr. 1998.

PAULA, A. A.; FALCAO, M. C.; PACHECO, A. G. Metabolic syndrome in HIV-infected individuals: underlying mechanisms and epidemiological aspects. **AIDS research and therapy**, v. 1, n. 10, p. 32-40, dez. 2013.

PÉREZ, C. V. et al. Dual roles of endogenous and exogenous galectin-1 in the control of testicular immunopathology. **Scientific Reports**, v. 5, p. 12259, jul. 2015.

PIATAK, M. J. et al. High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. **Science**, v. 259, n. 5102, p. 1749–1754, mar. 1993.

PINCHING, A. J. The acquired immune deficiency syndrome. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 56, n. 1, p. 1-13, abr. 1984.

PION, M. et al. HIV infection of human regulatory T cells downregulates Foxp3 expression by increasing DNMT3b levels and DNA methylation in the FOXP3 gene. **AIDS**, v. 27, n. 13, p. 2019-2029, ago. 2013.

PISTOIA, V. et al. Soluble HLA-G: Are they clinically relevant? **Seminars in Cancer Biology**, v. 17, n. 6, p. 469-479, dez. 2007.

PONCINI, C. V. et al. *Trypanosoma cruzi* infection imparts a regulatory program in dendritic cells and T cells via galectin-1–dependent mechanisms. **The Journal of Immunology**, v. 195, p. 3311-3324, set. 2015.

PUREN, A. J.; FANTUZZI, G.; DINARELLO, C. A. Gene expression, synthesis, and secretion of interleukin 18 and interleukin 1beta are differentially regulated in human blood mononuclear cells and mouse spleen cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 5, p. 2256-2261, mar. 1999.

QUINN, T. C. et al. Viral load and heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. **New England Journal of Medicine**, v. 342, n. 13, p. 921–929, mar. 2000.

RABINOVICH, G. A. et al. Galectin-1 as a potential cancer target. **British Journal of Cancer**, v. 92, p. 188-1192, 2005.

RABINOVICH, G. et al. Regulated expression of a 16-kd galectin-like protein in activated rat macrophages. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 59, n. 3, p. 363-370, mar. 1996.

RAJAGOPALAN, S.; LONG, E. O. Cellular senescence induced by CD158d reprograms natural killer cells to promote vascular remodeling. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 50, p. 20596-20601, dez. 2012a.

RAJAGOPALAN, S.; LONG, E. O. KIR2DL4 (CD158d): An activation receptor for HLA-G. **Frontiers of Immunology**, v. 3, n. 258, ago. 2012b.

RAMHORST, R. E. et al. Galectin-1 confers immune privilege to human trophoblast: implications in recurrent fetal loss. **Glicobiology**, v. 22, n. 1372-1386, 2012.

RAVICHANDRAN, K. S. Beginnings of a good apoptotic meal: the find-me and eat-me signaling pathways. **Immunity**, v. 35, n. 4, p. 445-455, out. 2011.

REDOSCHI, B. R. L. et al. Uso rotineiro do teste anti-HIV entre homens que fazem sexo com homens: do risco à prevenção. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 33, n. 4, 2017.

REGIDOR, D. L. et al. Effect of highly active antiretroviral therapy on biomarkers of B-lymphocyte activation and inflammation. **AIDS**, v. 25, n. 3, p. 303-314, jan. 2011.

RIDANO, M. E. et al. Galectin-1 expression imprints a neurovascular phenotype in proliferative retinopathies and delineates responses to anti-VEGF. **Oncotarget**, v. 8, p. 32505-32522, 2017.

RISTICH, V. et al. Mechanisms of prolongation of allograft survival by HLA-G/ILT4-modified dendritic cells. **Human Immunology**, v. 68, n. 4, p. 264-271, abr. 2007.

RITEAU, B. et al. HLA-G inhibits the allogeneic proliferative response. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 43, n. 2, p. 203-211, jul. 1999.

RIZZO, R. et al. Role of HLA-G 14bp deletion/insertion and +3142C/G polymorphisms in the production of sHLA-G molecules in relapsing-remitting multiple sclerosis. **Human Immunology**, v. 73, n. 11, p. 1140-1146, 2012.

ROTTINGEN, J. A.; CAMERON, D. W.; GARNETT, G. P. A systematic review of the epidemiologic interactions between classic sexually transmitted diseases and HIV: how much really is known? **Sexually Transmitted Disease**, v. 28, n. 10 579-597, out. 2001.

RUBINSTEIN, N. et al. Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection; A potential mechanism of tumor-immune privilege. **Cancer Cell**, v. 5, p. 241-251, 2004.

RUDENSKY, A. Y. Regulatory T cells and Foxp3. **Immunological Reviews**, v. 241, n. 1, p. 260-268, mai. 2011.

RUTKOWSKI, M. R. et al. Microbially driven TLR5-dependent signaling governs distal malignant progression through tumor-promoting inflammation. **Cancer Cell**, v. 27, p. 27-40, 2015.

SAMSON, M. et al. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. **Nature**, v. 382, n. 6593, p. 722-725, ago. 1996.

SANDLER, N. G. et al. Plasma levels of soluble CD14 independently predict mortality in HIV infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 203, n. 6, p. 780-790, mar. 2011.

SANTUCCI, L. et al. Galectin-1 suppresses experimental colitis in mice. **Gastroenterology**, v. 124, p. 1381-1394, 2003.

SCHACKER, T. W. et al. Clinical and epidemiologic features of primary HIV infection. **Annals of Internal Medicine**, v. 125, n. 4, p. 257-264, ago. 1996.

SCHACKER, T. W. et al. Collagen deposition in HIV-1 infected lymphatic tissues and T cell homeostasis. **The Journal of Clinical Investigation**, v.110, n. 8, p. 1133–1139, out. 2002.

SEGAT, L. et al. HLA-G 14 bp deletion/insertion polymorphism and mother-to-child transmission of HIV. **Tissue Antigens**, v. 83, n. 3, p. 161-167, mar. 2014.

SEROPIAN, I. M. et al. Galectin-1 controls cardiac inflammation and ventricular remodeling during acute myocardial infarction. **The American Journal of Pathology**, v. 182, p. 29-40, 2013.

SHEHJAR, F. et al. Association of FoxP3 promoter polymorphisms with the risk of Graves' disease in ethnic Kashmiri population. **Gene**, v. 672, p. 88-92, set. 2018.

SHEVACH, E. M. CD4⁺CD25⁺ suppressor T cells: more questions than answers. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 6, p. 389–400, jun. 2002.

SHEVACH, E. M. Mechanisms of foxp3⁺ T regulatory cell-mediated suppression. **Immunity**, v. 30, n. 5, p. 636–645, mai. 2009.

SHIELS, M. S. et al. A meta-analysis of the incidence of non-AIDS cancers in HIV-infected individuals. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 5, n. 52, p. 611–622, dez. 2009.

SHIROISHI, M. et al. Efficient Leukocyte Ig-like Receptor Signaling and Crystal Structure of Disulfide-linked HLA-G Dimer. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 15, p. 10439–10447, abr. 2006.

SHLIPAK, M. G. et al. Elevations of inflammatory and procoagulant biomarkers in elderly persons with renal insufficiency. **Circulation**, v.107, n. 1, p. 87–92, jan. 2003.

SIQUEIRA-BATISTA, R. et al. Linfócitos T CD4⁺CD25⁺ e a regulação do sistema imunológico: perspectivas para o entendimento fisiopatológico da sepse. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 24, n. 3, p. 294-301, set. 2012.

SOUZA, D. M. et al. Upregulation of Soluble HLA-G5 and HLA-G6 Isoforms in the Milder Histopathological Stages of Helicobacter pylori Infection: A Role for Subverting Immune Responses? **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 83, n. 1, p. 38-43, jan. 2016.

ST-PIERRE, C. et al. Host-soluble galectin-1 promotes HIV-1 replication through a direct interaction with glycans of viral gp120 and host CD4. **Journal of Virology**, v. 85, n. 22, p. 11741-11751, nov. 2011.

- STACEY, A. R. et al. Induction of a striking systemic cytokine cascade prior to peak viremia in acute human immunodeficiency virus type 1 infection, in contrast to more modest and delayed responses in acute hepatitis B and C virus infections. **Journal of Virology**, v. 83, n. 8, p. 3719–3733, abr. 2009.
- STAROSSOM, S. C. et al. Galectin-1 deactivates classically activated microglia and protects from inflammation-induced neurodegeneration. **Immunity**, v. 37, p. 249-263, 2012.
- STEIN, J. H.; HSUE, P. Y. Inflammation, immune activation, and CVD risk in individuals with HIV infection. **JAMA**, v. 4, n. 308, p. 405-406, jul. 2012.
- STOWELL S. R.; CUMMINGS R. D. **Galectins Methods and Protocols**. 1. ed. Nova York: Humana Press, 2014.
- SUBRAMANIAN, S. et al. Arterial inflammation in patients with HIV. **JAMA**, v. 308, n. 4, p. 379-386, jul. 2012.
- SUNDBLAD, V. et al. Galectin-1: A jack-of-all-trades in the resolution of acute and chronic inflammation. **The Journal of Immunology**, v. 199, p. 3721-3730, nov. 2017.
- SURYAWANSHI, A. et al. Galectin-1–mediated suppression of *Pseudomonas aeruginosa*–induced corneal immunopathology. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 2, p. 6391-6409, jun. 2013.
- TABRIZI, S. J. et al. T cell leukemia/ lymphoma 1 and galectin-1 regulate survival/cell death pathways in human naive and IgM+ memory B cells through altering balances in Bcl-2 family proteins. **The Journal of Immunology**, v. 182, p. 1490-1499, 2009.
- TAN, Z. et al. Allele-Specific Targeting of microRNAs to HLA-G and Risk of Asthma. **The American Journal of Human Genetics**, v. 81, n. 4, p. 829–834, 2007.
- TEXEIRA, A.C. et al. The 14bp-deletion allele in the HLA-G gene confers susceptibility to the development of hepatocellular carcinoma in the Brazilian population. **Tissue Antigens**, v. 81, p. 408 - 413, 2013.
- THIEMANN, S.; BAUM, L. G. Galectins and immune responses-Just how do they do those things they do? **Annual Review of Immunology**, v. 20, n. 34, p. 243-264, mai. 2016.
- TIAN, C. et al. Mitochondrial glutaminase release contributes to glutamate-mediated neurotoxicity during human immunodeficiency virus-1 infection. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 7, n. 3, p. 619-618, abr. 2012.
- TINDALL, B. et al. Characterization of the acute clinical illness associated with human immunodeficiency virus infection. **Journal of American Medical Association: Internal Medicine**, v. 148, n. 4, p. 945–949, abr. 1988.
- TONE, M; GREENE, M. I. Cooperative regulatory events and Foxp3 expression. **Nature Immunology**, v. 12, n. 1, p. 14-16, jan. 2011.

TORRE, D; PUGLIESE, A. Interleukin-18: a proinflammatory cytokine in HIV-1 infection. **Current HIV Research**, v. 4, n. 4, p. 423-430, out. 2006.

TRAN, T. A. et al. Resting regulatory CD4 T cells: a site of HIV persistence in patients on long-term effective antiretroviral therapy. **PLoS One**, v.3, n. 10, out. 2008.

TRAUTMANN, L. et al. 2006. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8⁺ T cells leads to reversible immune dysfunction. **Nature Medicine**. v. 12, n. 10, p. 1198–1202, out. 2006.

TRIENT, V. A. et al. Fracture prevalence among human immunodeficiency virus (HIV)-infected versus non-HIV-infected patients in a large U.S. healthcare system. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.9, n. 93, p. 3499–3504, set. 2008.

TRIPATHI, P.; AGRAWAL, S. The Role of Human Leukocyte Antigen E and G in HIV Infection. **AIDS**, v. 11, n. 21, p. 1395-1404, jul. 2007.

TSUJIMURA, K. et al. Characterization of murine CD160⁺ CD8⁺ T lymphocytes. **Immunology Letters**, v. 106, n. 1, p. 48-56, jul. 2006.

UNAIDS BRASIL. PROGRAMA CONJUNTO DAS NAÇÕES UNIDAS SOBRE HIV/AIDS NO BRASIL. **90-90-90 UMA META AMBICIOSA DE TRATAMENTO PARA CONTRIBUIR PARA O FIM DA EPIDEMIA DE AIDS**, 2015. Disponível em: <http://unaids.org.br/wp-content/uploads/2015/11/2015_11_20_UNAIDS_TRATAMENTO_META_PT_v4_GB.pdf> Acesso em: 8 set. 2017.

UNAIDS. JOINT UNITED NATIONS PROGRAM ON HIV/AIDS. **WOMEN AND GIRLS AND HIV**, 2018. Disponível em: <http://www.unaids.org/en/resources/documents/2018/women_girls_hiv>. Acesso em: 28 mar. 2018.

UNAIDS. JOINT UNITED NATIONS PROGRAM ON HIV/AIDS. **UNAIDS DATA**, 2017. Disponível em: <http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/20170720_Data_book_2017_en.pdf>. Acesso em: 20 ago. 2017.

VASIREDDI, M. HLA-G: A Versatile Biomarker. **Biomarkers Journal**, v. 3, n. 1, fev. 2017.

VEAZEY, R. S. et al. Gastrointestinal tract as a major site of CD4⁺ T cell depletion and viral replication in SIV infection. **Science**, v. 280, n. 5362, p. 427-431, abr. 1998.

VIGANÒ, S. et al. HLA-G⁺ HIV-1-specific CD8⁺ T cells are associated with HIV-1 immune control. **AIDS**, v. 31, n. 2, p. 207-212, jan. 2017.

WADA, N. I. et al. The effect of HAART-induced HIV suppression on circulating markers of inflammation and immune activation. **AIDS**, v. 29, n. 4, p. 463-471, fev. 2015.

- WALKER, M. R. et al. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4⁺CD25⁺T cells. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 9, p. 1437–1443, nov. 2003.
- WALSTON, J. et al. Frailty and activation of the inflammation and coagulation systems with and without clinical comorbidities: results from the Cardiovascular Health Study. **Archives of Internal Medicine**, v. 162, n. 20, p. 2333–2341, nov. 2002.
- WANG, X.; JIANG, W.; ZHANG, D. Association of 14-bp insertion/deletion polymorphism of HLA-G gene with unexplained recurrent spontaneous abortion: a meta-analysis. **Tissue Antigens**, v. 81, n. 2, p. 108–115, 2013.
- WEISS, H. A.; QUIGLEY, M. A.; HAYES, R. J. Male circumcision and risk of HIV infection in sub-Saharan Africa: a systematic review and meta-analysis. **AIDS**, v. 14, n. 15, p. 2361–2370, out. 2000.
- WEISS, R. A. Thirty years on: HIV receptor gymnastics and the prevention of infection. **BMC Biology**, v. 11, n. 57, p. 1–5, mai. 2013.
- WEITZMANN, M. N.; PACIFICI, R. Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 5, n. 116, p. 1186–1194, mai. 2006.
- WHERRY, E. J. et al. Molecular signature of CD8⁺ T cell exhaustion during chronic viral infection. **Immunity**, v. 27, n. 24, p. 670–684, out. 2007.
- WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **CONSOLIDATED GUIDELINES ON THE USE OF ANTIRETROVIRAL DRUGS FOR TREATING AND PREVENTING HIV INFECTION: RECOMMENDATIONS FOR A PUBLIC HEALTH APPROACH**, 2^a ed., 2016. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/208825/9789241549684_eng.pdf?sequence=1>. Acesso em: 30 jun. 2018.
- WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **HIV/AIDS**, 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/features/qa/71/en/>> Acesso em: 20 jun. 2018.
- WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **HIV/AIDS**, 2018. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs360/en/>>. Acesso em: 20 jun. 2018.
- WIENDL, H. et al. Expression of the immune-tolerogenic major histocompatibility molecule HLA-G in multiple sclerosis: implications for CNS immunity. **Brain**, v. 128 p. 2689–2704, ago. 2005.
- WILLIAMS, M. et al. Direct binding of human immunodeficiency virus type 1 Nef to the major histocompatibility complex class I (MHC-I) cytoplasmic tail disrupts MHC-I trafficking. **Journal of Virology**, v. 23, n. 76, p. 12173–12184, dez. 2002.
- WORM, S. W.; LUNDGREN, J. D. The metabolic syndrome in HIV. **Best Practice & Research: Clinical Endocrinology & Metabolism**, n. 25, p. 479–486, 2011.

WU, L.; KEWALRAMANI, V. N. Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. **Nature Review Immunology**, v. 6, n. 11, p. 859–868 nov. 2006.

XIE, R. D. et al. Galectin-1 inhibits oral-intestinal allergy syndrome. **Oncotarget**, v. 8, p. 13214-13222, 2017.

XU, G. G.; GUO, J.; WU, Y. Chemokine receptor CCR5 antagonist Maraviroc: medicinal chemistry and clinical applications. **Current Topics on Medicinal Chemistry**, v.14, n. 13, p. 1504-1514, 2014.

YANIK, E. L.; KATKI, H. A.; ENGELS, E. A. Cancer risk among the HIV-infected elderly in the United States. **AIDS**, v. 10, n. 30, p. 1663–1668, jun. 2016.

YAO, J. et al. FOXP3 polymorphisms in interstitial lung disease among Chinese Han population: A genetic association study. **The Clinical Respiratory Journal**, v. 12, n. 13, p. 1182-1190, mar. 2018.

ZAHEDNASAB, H. KARAMPOOR, S. The correlation of HLA-G with multiple sclerosis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 291, n. 28, fev. 2016.

ZENG, M. et al. Cumulative mechanisms of lymphoid tissue fibrosis and T cell depletion in HIV-1 and SIV infections. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 121, n. 3, p. 998-1008, mar. 2011.

ZHANG, D.; LI, W.; JIANG, S. Peptide fusion inhibitors targeting the HIV-1 gp41: a patent review (2009 - 2014). **Expert Opinion on Therapeutics Patents**, v. 25, n. 2, p. 159-173, nov. 2014.

ZHOU, H. et al. HIV protease inhibitors activate the unfolded protein response and disrupt lipid metabolism in primary hepatocytes. **American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 291, n. 6, p. G1071-1080, dez. 2006.

ZÚÑIGA, E. et al. Regulated expression and effect of galectin-1 on Trypanosoma cruzi-infected macrophages: modulation of microbicidal activity and survival. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 11, p. 6804-6812, nov. 2001b.

ZÚÑIGA, E. et al. Regulated expression of galectin-1 during B-cell activation and implications for T-cell apoptosis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 70, p. 73-79, 2001a.

ANEXO A – APROVAÇÃO DO CEP

CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE/UFES



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise de Polimorfismos Gênicos de Moléculas Imunorregulatórias em pacientes portadores de HIV

Pesquisador: João Alexandre

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 60733316.5.0000.5060

Instituição Proponente: Centro de Ciências da Saúde

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESPÍRITO SANTO - FAPES

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.871.107

Apresentação do Projeto:

Pesquisador responsável: João Alexandre Tres Pancoto

Instituição: CCS/UFES

Finalidade acadêmica: Mestrado

Curso: PPG Ciências Farmacêuticas

JUSTIFICATIVA: A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) é uma doença causada por uma infecção crônica do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). A infecção por HIV é considerada uma das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo, acometendo desde o início da epidemia mais de 75 milhões pessoas. No Brasil, a taxa de detecção de AIDS tem apresentado estabilização com a região Sudeste tendo queda nos últimos dez anos. Contudo o município de Vitória, no estado do Espírito Santo, tem apresentado aumento da média de casos na região em números absolutos, destacando-se a faixa etária juvenil (entre 15 e 24 anos). Essas variações epidemiológicas corroboram a importância da compreensão dos fatores de risco da infecção pelo HIV em locais e regiões específicos, a fim de formar novas estratégias locais de ação preventiva e terapêutica. Fatores virais, bem como a resposta imune do hospedeiro, têm sido implicados na patogenia e no resultado clínico da infecção por HIV. Nesse contexto, os polimorfismos das

Endereço: Av. Marechal Campos 1468

Bairro: S/N

CEP: 29.040-091

UF: ES

Município: VITÓRIA

Telefone: (27)3335-7211

E-mail: cep.ufes@hotmail.com

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE/UFES



Continuação do Parecer: 1.871.107

moléculas imunorregulatórias HLA-G e FOXP3 podem modificar de maneira importante a resposta imune contra o HIV. Uma vez que essas moléculas imunorregulatórias desempenham importante função na patogenia e prognóstico da infecção, estudos que busquem relacionar os polimorfismos dos genes HLA-G e FOXP3 com a infecção tornam-se promissores para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficientes que melhorem a qualidade de vida das pessoas que vivem com HIV/AIDS (PVHA).

OBJETIVO PRINCIPAL: Este estudo se propõe a avaliar os polimorfismos gênicos do HLA-G e FOXP3 e relacioná-los com os achados epidemiológicos, laboratoriais e clínicos de PVHA em diferentes estágios de tratamento, visto que no Brasil ainda não foram realizadas pesquisas buscando estabelecer o papel dessas moléculas na infecção pelo HIV.

LOCAL DO ESTUDO: CTA e HEMOES

INTERVENÇÃO/PROCEDIMENTOS: O sangue total dos pacientes infectados e sadios será colhido por punção venosa, utilizando-se sistema à vácuo com anticoagulante EDTA pelos profissionais habilitados do CTA e do HEMOES. Serão necessários cerca de 12 mL de sangue por paciente e indivíduo controle.

BENEFÍCIOS: Este estudo contribuirá para o melhor conhecimento da doença auxiliando futuramente no desenvolvimento de terapias que melhorem a qualidade de vida destes pacientes.

Objetivo da Pesquisa:

O presente projeto tem como objetivo geral avaliar os polimorfismos de genes relacionados às moléculas imunorregulatórias HLA-G e FOXP3 associando com os achados laboratoriais e clínicos de pessoas que vivem com HIV/AIDS em diferentes estágios de tratamento, estabelecendo melhor a função dessas moléculas para a regulação da resposta imune nessa doença.

Coletar amostras biológicas das PVHA e de indivíduos saudáveis (grupo controle); Extrair DNA e criar banco de amostras biológicas; Analisar prontuários dos pacientes para obtenção das características clínicas, laboratoriais e medicações que estão sendo utilizadas no tratamento; Avaliar os polimorfismos gênicos de HLA-G e FOXP3; Associar os polimorfismos gênicos com os achados clínicos, laboratoriais e de tratamento das PVHA, avaliando riscos dos mesmos desenvolverem outras patologias decorrentes da AIDS.

Endereço: Av. Marechal Campos 1468

Bairro: S/N

CEP: 29.040-091

UF: ES

Município: VITÓRIA

Telefone: (27)3335-7211

E-mail: cep.ufes@hotmail.com

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE/UFES



Continuação do Parecer: 1.871.107

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

De acordo com o pesquisador, os riscos e benefícios do projeto são:

-RISCOS: A coleta de amostras de sangue venoso pode ocasionar contaminações, pequena dor e desconforto com a picada da agulha ou ainda extravasamento sanguíneo subcutâneo sem gravidade, que pode resultar em leve dor localizada e formação de um pequeno hematoma. Para minimizar o risco de contaminações e formação de hematomas, a coleta de sangue será realizada por um profissional com experiência e capacidade técnica do próprio ambulatório do CTA para os pacientes e pelo próprio flebotomista do HEMOES para os indivíduos controle. Todos os procedimentos serão realizados com material estéril da melhor qualidade. Caso haja alguma complicação durante o procedimento, o paciente e/ou indivíduo controle será prontamente atendido.

-BENEFÍCIOS: Este estudo contribuirá para o melhor conhecimento da doença auxiliando futuramente no desenvolvimento de terapias que melhorem a qualidade de vida destes pacientes.

De acordo com a Res. CNS n°466/12, "Toda pesquisa com seres humanos envolve risco em tipos e gradações variados."

Desta forma, os riscos e benefícios, conforme descritos pelo pesquisador, atendem as exigências da Resolução CNS n° 466/12.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto de pesquisa potencialmente relevante, com benefícios previstos prevalecendo sobre os riscos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

No projeto constam os seguintes documentos:

- Folha de rosto: apresentada e adequada
- Projeto detalhado: apresentado e adequado
- TCLE: apresentado e adequado
- Termo de Sigilo e Confidencialidade: apresentado e adequado
- Termo de anuência da instituição onde a pesquisa será realizada: apresentada e adequada
- Cronograma: apresentado e adequado
- Orçamento: apresentado e adequado

Endereço: Av. Marechal Campos 1468

Bairro: S/N

CEP: 29.040-091

UF: ES

Município: VITÓRIA

Telefone: (27)3335-7211

E-mail: cep.ufes@hotmail.com

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE/UFES



Continuação do Parecer: 1.871.107

Os termos de apresentação obrigatória estão em conformidade com a Resolução CNS 466/12.

Recomendações:

Antes de submeter ou ressubmeter seu projeto de pesquisa para o CEP verifique as recomendações abaixo:

Alguns projetos encaminhados ao CEP têm apresentado problemas que tem dificultado a apreciação dos mesmos, atrasando a emissão do parecer e sobrecarregando o colegiado com o grande número de projetos com pendências. Desta forma, o CEP, vem por meio desse encaminhar algumas recomendações, baseadas na RESOLUÇÃO CNS Nº 466, DE 12 DE DEZEMBRO DE 2012 a serem observadas para agilizar a avaliação dos projetos.

1. De acordo com a referida resolução, XI.2 "Cabe ao pesquisador: a) apresentar o protocolo devidamente instruído ao CEP ou à CONEP, aguardando a decisão de aprovação ética, antes de iniciar a pesquisa", ou seja, **NENHUMA ETAPA DA PESQUISA QUE ENVOLVA QUALQUER CONTATO COM OS PARTICIPANTES OU SEUS DADOS PODE SER INICIADA ANTES DA APROVAÇÃO DO CEP.**
2. A res. CNS 466/12 dispõe: "V – DOS RISCOS E BENEFÍCIOS; Toda pesquisa com seres humanos envolve risco em tipos e gradações variados", portanto o pesquisador deverá prever quais situações poderão atingir física ou mentalmente um sujeito. Questionários, por exemplo, podem demandar tempo, causar constrangimento, fazer a pessoa a reviver experiências que podem causar sofrimento psíquico, causar ansiedade, expor informações de um grupo ou comunidade específica, etc. Assim o pesquisador deverá, em todo tipo de projeto, relatar os possíveis riscos mesmo que mínimos, e também as providências e cautelas a serem empregadas para evitar e/ou reduzir os riscos citados.
3. O cronograma deve prever o tempo para os trâmites no CEP. Deve-se considerar a possibilidade do projeto não ser aprovado na primeira avaliação e possuir pendências, além do calendário de reuniões. Dessa forma, o projeto depois de adaptado terá que ser novamente avaliado. Isso pode acarretar em atrasos. Assim, nunca deixe para submeter o projeto, contanto com a aprovação na primeira avaliação.
4. Cumprir com rigor as exigências da Res. CNS 466/12, IV, que trata do Consentimento Livre e Esclarecido. Foi disponibilizado um modelo de TCLE pelo CEP – CCS/UFES a fim de auxiliar na elaboração do referido documento.
5. Verificar se o projeto está sendo vinculando ao CCS, pois caso contrário o projeto pode ser

Endereço: Av. Marshal Campos 1468

Bairro: S/N

CEP: 29.040-091

UF: ES

Município: VITÓRIA

Telefone: (27)3335-7211

E-mail: cep.ufes@hotmail.com

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE/UFES



Continuação do Parecer: 1.871.107

encaminhado para outro CEP/UFES.

6. A Folha de Rosto que deverá ser digitalizada e anexada ao protocolo será gerada pela plataforma. Não usar o modelo disponível no site do CONEP.

7. Caso tenha alguma dificuldade em utilizar a Plataforma Brasil (como inclusão de anexo, etc), sugerimos mudar de navegador.

8. Informar e comprovar a existência de Biorrepositório ou Biobanco. A não comprovação inviabiliza a aprovação do projeto.

9. Caso o acesso aos participantes ocorra em local diferente da instituição proponente, uma carta de anuência assinada pelo responsável por este local precisa ser apresentada — por exemplo, hospital, unidade de saúde, escola, asilo, creche, etc.

10. Caso no projeto conste o uso de dados secundários, como prontuários médicos ou outros bancos de dados do tipo, uma carta de anuência assinada pelo responsável pelos dados precisa ser apresentada. Neste caso, ainda é obrigatório a apresentação de um termo de sigilo, privacidade e confidencialidade assinado pelo pesquisador responsável pelo projeto proposto.

11. O orçamento detalhado precisa ser apresentado, independentemente se o projeto caracteriza-se como “financiamento próprio” ou não.

ALGUNS DOCUMENTOS IMPORTANTES

- Resolução CNS nº 466/12 — diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos: <http://conselho.saude.gov.br/resolucoes/2012/Reso466.pdf>

- Resolução CNS nº 441/11 — armazenamento e utilização de material biológico humano com finalidade de pesquisa (Biorrepositório ou Biobanco): <http://conselho.saude.gov.br/resolucoes/2011/Reso441.pdf>

- Modelo para elaboração do TCLE preparado pelo CEP/CCS/UFES: http://ccs.ufes.br/sites/ccs.ufes.br/files/Roteiro%20para%20elaborac%C3%A7%C3%A3o%20do%20TCLE_0.pdf

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as pendências foram adequadas, estando o projeto de acordo com as exigências do CEP/CONEP a partir da Resolução do CNS nº 466.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Endereço: Av. Marechal Campos 1468

Bairro: S/N

CEP: 29.040-091

UF: ES

Município: VITÓRIA

Telefone: (27)3335-7211

E-mail: cep.ufes@hotmail.com

CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE/UFES

Continuação do Parecer: 1.871.107

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_804480.pdf	05/12/2016 16:41:51		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEHEMOES.pdf	05/12/2016 16:38:40	João Alexandre	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLECTA.pdf	05/12/2016 16:38:05	João Alexandre	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	CARTARESPOSTA.PDF	05/12/2016 16:37:00	João Alexandre	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoCEPNovo.pdf	05/12/2016 16:23:04	João Alexandre	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEHIVNovo.pdf	05/12/2016 16:21:43	João Alexandre	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEControlesNovo.pdf	05/12/2016 16:21:07	João Alexandre	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DeclaracaoSigilo2.PDF	05/12/2016 15:42:53	João Alexandre	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DeclaracaoSigilo1.PDF	05/12/2016 15:42:32	João Alexandre	Aceito
Outros	AtaBiorepositorio.docx	04/10/2016 15:17:55	João Alexandre	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	NormasBiorepositorio.docx	04/10/2016 15:16:06	João Alexandre	Aceito
Outros	DeclaracaoAnuencia.PDF	04/10/2016 15:15:20	João Alexandre	Aceito
Outros	DeclaracaoCEP.PDF	04/10/2016 15:11:50	João Alexandre	Aceito
Folha de Rosto	FolhaderostoCEP.PDF	04/10/2016 15:07:01	João Alexandre	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Marechal Campos 1468

Bairro: S/N

CEP: 29.040-091

UF: ES

Município: VITÓRIA

Telefone: (27)3335-7211

E-mail: cep.ufes@hotmail.com

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE/UFES**



Continuação do Parecer: 1.871.107

VITÓRIA, 16 de Dezembro de 2016

Assinado por:
KARLA DE MELO BATISTA
(Coordenador)

Endereço: Av. Marechal Campos 1468

Bairro: BH

UF: ES

Município: VITÓRIA

Telefone: (27)3335-7211

CEP: 29.040-091

E-mail: cap.ufes@hotmail.com

ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - PACIENTES

O(A) Sr.(a) _____ foi convidado (a) a participar da pesquisa intitulada ANÁLISE DE POLIMORFISMOS GÊNICOS DE MOLÉCULAS IMUNORREGULATÓRIAS EM PACIENTES PORTADORES DE HIV NO MUNICÍPIO DE VITÓRIA NO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO, sob a responsabilidade de JOÃO ALEXANDRE TRÉS PANCOTO (professor/pesquisador) e NATALIA ALVES CORTELETTE (pesquisadora/mestranda).

JUSTIFICATIVA

Apesar de tratamentos, testes gratuitos, aconselhamentos e campanhas para prevenção da doença disponíveis, há ainda elevado número de pessoas infectadas pelo vírus HIV. Dessa forma, estudos voltados para avaliação da resposta imunológica frente a este vírus são importantes para o melhor entendimento da doença podendo contribuir para melhora da qualidade de vida dos pacientes.

OBJETIVO(S) DA PESQUISA

Avaliar os polimorfismos de genes relacionados a moléculas imunorregulatórias HLA-G e FOXP3 e relacionando com os achados laboratoriais e clínicos de pessoas que vivem com HIV/AIDS em diferentes estágios de tratamento, estabelecendo melhor a função dessas moléculas para a regulação da resposta imune nessa doença.

PROCEDIMENTOS

Este estudo necessita de amostras de sangue venoso e, por isso, é solicitado ao (à) Sr.(a) a permissão para colher aproximadamente 12 mL de sangue e caso o Sr.(a) concorde, a permissão para guardar o sangue restante para estudos futuros. Esse material será cuidadosamente armazenado em tubos de plástico, acondicionados dentro de caixas identificadas por códigos, que serão mantidas em freezer -80°C, por um período de 10 anos constituindo um biorrepositório já aprovado pelo departamento de Ciências Farmacêuticas da UFES. É solicitado ainda permissão para coletar dados clínicos e laboratoriais que constem em prontuário médico.

DURAÇÃO E LOCAL DA PESQUISA

Os procedimentos serão realizados em local apropriado para coleta de sangue do próprio Centro de Referência IST/AIDS de Vitória. A coleta da amostra será feita em apenas um

momento não havendo necessidade do paciente retornar ao ambulatório para apenas atender a finalidade do estudo.

RISCOS E DESCONFORTOS

A coleta de amostras de sangue venoso pode ocasionar pequena dor e desconforto com a picada da agulha ou ainda extravasamento sanguíneo subcutâneo sem gravidade, que pode resultar em leve dor localizada e formação de um pequeno hematoma. Existe ainda o risco de contaminações. Para minimizar o risco de contaminações e formação de hematomas, a coleta de sangue será realizada por um profissional com experiência e capacidade técnica do próprio Centro de Referência IST/AIDS com material estéril e da melhor qualidade.

BENEFÍCIOS

Com a sua colaboração poderemos entender melhor as características da sua doença podendo contribuir desta forma na melhora da terapia e qualidade de vida.

ACOMPANHAMENTO E ASSISTÊNCIA

Durante e após o término dos trabalhos de pesquisa, o(a) Sr.(a) será devidamente acompanhado(a) pelos médicos que estão cuidando do Sr (a) e terá a garantia de receber o esclarecimento de qualquer dúvida e informações sobre este estudo.

GARANTIA DE RECUSA EM PARTICIPAR DA PESQUISA E/OU RETIRADA DE CONSENTIMENTO

O(A) Sr.(a) não é obrigado(a) a participar da pesquisa, podendo deixar de participar dela em qualquer momento de sua execução, sem que haja penalidades ou prejuízos decorrentes de sua recusa. Caso decida retirar seu consentimento, o(a) Sr.(a) não mais será contatado(a) pelos pesquisadores.

GARANTIA DE MANUTENÇÃO DO SIGILO E PRIVACIDADE

Os pesquisadores se comprometem a resguardar sua identidade durante todas as fases da pesquisa, inclusive após publicação.

GARANTIA DE RESSARCIMENTO FINANCEIRO

Os pacientes envolvidos no estudo não terão nenhum gasto caso aceitem participar, visto que o material utilizado na coleta de sangue será custeado pelo pesquisador responsável. O momento da coleta será durante a consulta de rotina do paciente no Centro de Referência IST/AIDS não havendo necessidade do paciente se deslocar para o local apenas para atender a pesquisa.

GARANTIA DE INDENIZAÇÃO

De acordo com o item IV.4.c da Resolução CNS 466/12, o Sr.(a) apresenta direito de indenização mediante decisão judicial, caso haja eventuais danos decorrentes da pesquisa.

ESCLARECIMENTO DE DÚVIDAS

Em caso de dúvidas sobre a pesquisa ou para relatar algum problema, o(a) Sr.(a) pode contatar o(a) pesquisador JOÃO ALEXANDRE TRÉS PANCOTO no telefone 3335 7556, ou no endereço Avenida Marechal Campos, nº 1468, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Campus Maruípe, Universidade Federal do Espírito Santo, Maruípe, Vitória, ES. O(A) Sr.(a) também pode contatar o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo (CEP/CCS/UFES) através do telefone (27) 3335-7211, e-mail cep.ufes@hotmail.com ou correio: Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, Prédio Administrativo do CCS, Av. Marechal Campos, 1468, Maruípe, CEP 29.040-090, Vitória - ES, Brasil. O CEP/CCS/UFES tem a função de analisar projetos de pesquisa visando à proteção dos participantes dentro de padrões éticos nacionais e internacionais. Seu horário de funcionamento é de segunda a sexta-feira, das 8h às 14h.

Declaro que fui verbalmente informado e esclarecido sobre o presente documento, entendendo todos os termos acima expostos, e que voluntariamente aceito participar deste estudo. Também declaro ter recebido uma via deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de igual teor, assinada pelo(a) pesquisador(a) principal ou seu representante, rubricada em todas as páginas.

Vitória, _____ de _____ de _____.

Participante da pesquisa/Responsável legal

Na qualidade de pesquisador responsável pela pesquisa “ANÁLISE DE POLIMORFISMOS GÊNICOS DE MOLÉCULAS IMUNORREGULATÓRIAS EM PACIENTES PORTADORES DE HIV NO MUNICÍPIO DE VITÓRIA NO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO”, eu, NATALIA ALVES CORTELETTE, declaro ter cumprido as exigências do(s) item(s) IV.3 e IV.4 (se pertinente), da Resolução CNS 466/12, a qual estabelece diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos.

Pesquisador

ANEXO C - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - CONTROLES

O(A) Sr.(a) _____ foi convidado (a) a participar da pesquisa intitulada ANÁLISE DE POLIMORFISMOS GÊNICOS DE MOLÉCULAS IMUNORREGULATÓRIAS EM PACIENTES PORTADORES DE HIV NO MUNICÍPIO DE VITÓRIA NO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO, sob a responsabilidade de JOÃO ALEXANDRE TRÉS PANCOTO (professor/pesquisador) e NATALIA ALVES CORTELETTE (pesquisadora/mestranda).

JUSTIFICATIVA

Apesar de tratamentos, testes gratuitos, aconselhamentos e campanhas para prevenção da doença disponíveis, há ainda elevado número de pessoas infectadas pelo vírus HIV. Dessa forma, estudos voltados para avaliação da resposta imunológica frente a este vírus são importantes para o melhor entendimento da doença podendo contribuir para melhora da qualidade de vida dos pacientes.

OBJETIVO(S) DA PESQUISA

Avaliar os polimorfismos de genes relacionados às moléculas imunorregulatórias HLA-G e FOXP3 associando com os achados laboratoriais e clínicos de pessoas que vivem com HIV/AIDS em diferentes estágios de tratamento, estabelecendo melhor a função dessas moléculas para a regulação da resposta imune nessa doença.

PROCEDIMENTOS

Este estudo necessita de amostras de sangue venoso e, por isso, é solicitado ao (à) Sr.(a) a permissão para colher aproximadamente 12 mL de sangue e caso o Sr.(a) concorde, a permissão para guardar o sangue restante para estudos futuros. Esse material será cuidadosamente armazenado em tubos de plástico, acondicionados dentro de caixas identificadas por códigos, que serão mantidas em freezer -80°C, por um período de 10 anos constituindo um biorrepositório já aprovado pelo departamento de Ciências Farmacêuticas da UFES.

DURAÇÃO E LOCAL DA PESQUISA

Os procedimentos serão realizados em local apropriado para coleta de sangue no setor específico de coleta do Hemocentro do Espírito Santo (HEMOES) em Vitória. A coleta de amostra será feita em apenas um momento não havendo necessidade do paciente retornar ao ambulatório para apenas atender a finalidade do estudo.

RISCOS E DESCONFORTOS

A coleta de amostras de sangue venoso pode ocasionar pequena dor e desconforto com a picada da agulha ou ainda extravasamento sanguíneo subcutâneo sem gravidade, que pode resultar em leve dor localizada e formação de um pequeno hematoma. Para minimizar o risco de contaminações e formação de hematomas, a coleta de sangue será realizada por um profissional com experiência e capacidade técnica, o próprio flebotomista do HEMOES, com material estéril e da melhor qualidade.

BENEFÍCIOS

Com a sua colaboração poderemos entender melhor as características da sua doença podendo contribuir desta forma na melhora da terapia e qualidade de vida.

ACOMPANHAMENTO E ASSISTÊNCIA

Durante a coleta o(a) Sr.(a) será devidamente acompanhado(a) pelos profissionais que estão cuidando do Sr (a) no momento da doação de sangue. Caso haja alguma complicação durante o procedimento, o Sr (a) será prontamente atendido. Durante e após os procedimentos terá a garantia de receber o esclarecimento de qualquer dúvida e informações que possa ter sobre este estudo.

GARANTIA DE RECUSA EM PARTICIPAR DA PESQUISA E/OU RETIRADA DE CONSENTIMENTO

O(A) Sr.(a) não é obrigado(a) a participar da pesquisa, podendo deixar de participar dela em qualquer momento de sua execução, sem que haja penalidades ou prejuízos decorrentes de sua recusa. Caso decida retirar seu consentimento, o(a) Sr.(a) não será contatado(a) pelos pesquisadores.

GARANTIA DE MANUTENÇÃO DO SIGILO E PRIVACIDADE

Os pesquisadores se comprometem a resguardar sua identidade durante todas as fases da pesquisa, inclusive após publicação.

GARANTIA DE RESSARCIMENTO FINANCEIRO

Os participantes envolvidos no estudo não terão nenhum gasto caso aceitem participar, visto que o material utilizado na coleta de sangue será custeado pelo pesquisador responsável. O momento da coleta será durante a doação de sangue no HEMOES não havendo necessidade do paciente se deslocar para o local apenas para a coleta da pesquisa.

GARANTIA DE INDENIZAÇÃO

De acordo com o item IV.4.c da Resolução CNS 466/12, o Sr.(a) apresenta direito de indenização mediante decisão judicial, caso haja eventuais danos decorrentes da pesquisa.

ESCLARECIMENTO DE DÚVIDAS

Em caso de dúvidas sobre a pesquisa ou para relatar algum problema, o(a) Sr.(a) pode contatar o(a) pesquisador JOÃO ALEXANDRE TRÉS PANCOTO no telefone 3335 7556, ou no endereço Avenida Marechal Campos, nº 1468, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Campus Maruípe, Universidade Federal do Espírito Santo, Maruípe, Vitória, ES. O(A) Sr.(a) também pode contatar o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo (CEP/CCS/UFES) através do telefone (27) 3335-7211, e-mail cep.ufes@hotmail.com ou correio: Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, Prédio Administrativo do CCS, Av. Marechal Campos, 1468, Maruípe, CEP 29.040-090, Vitória - ES, Brasil. O CEP/CCS/UFES tem a função de analisar projetos de pesquisa visando à proteção dos participantes dentro de padrões éticos nacionais e internacionais. Seu horário de funcionamento é de segunda a sexta-feira, das 8h às 14h.

Declaro que fui verbalmente informado e esclarecido sobre o presente documento, entendendo todos os termos acima expostos, e que voluntariamente aceito participar deste estudo. Também declaro ter recebido uma via deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de igual teor, assinada pelo(a) pesquisador(a) principal ou seu representante, rubricada em todas as páginas.

Vitória, _____ de _____ de _____.

Participante da pesquisa/Responsável legal

Na qualidade de pesquisador responsável pela pesquisa “ANÁLISE DE POLIMORFISMOS GÊNICOS DE MOLÉCULAS IMUNORREGULATÓRIAS EM PACIENTES PORTADORES DE HIV NO MUNICÍPIO DE VITÓRIA NO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO”, eu, NATALIA ALVES CORTELETTE, declaro ter cumprido as exigências do(s) item(s) IV.3 e IV.4 (se pertinente), da Resolução CNS 466/12, a qual estabelece diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos.

Pesquisador